

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. M. Stangassinger  
angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. M. Stangassinger

**Einsatz von L-Glutamin und seine Wirkung auf den antioxidativen Status  
bei Galopprennpferden**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
von Bettina Brincker  
aus Wuppertal

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. H. Gerhards

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>6</b>
2.1	Bildung von Sauerstoffradikalen bei physischer Belastung .....	6
2.2	Bedeutung von Sauerstoffradikalen bei physischer Belastung.....	8
2.3	Vorkommen von Antioxidantien .....	10
2.4	Stoffwechsel und Wirkung von Glutathion.....	11
2.5	Antioxidative Wirkung von Glutathion.....	14
2.6	Bedeutung von Glutathion bei physischer Belastung .....	18
2.7	Stoffwechsel und Wirkung von L- Glutamin .....	20
2.8	Wirkung von Glutamin auf das Glutathion-System und seine Bedeutung .....	22
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1	Versuchstiere .....	25
4.2	Haltung, Fütterung und Training .....	25
4.3	Versuchsanordnung und Glutaminsupplementierung .....	26
4.4	Probennahme .....	27
4.5	Entnahme und Handhabung der Blutproben .....	27
4.6	Fixierung der Vollblut-Proben zur GSH/GSSG Analyse.....	28
4.7	Bestimmungsmethoden .....	29
4.7.1	Blutbild und klinisch-chemische Untersuchungen .....	29
4.7.1.1	Blutbild.....	29
4.7.1.2	Klinisch-chemische Untersuchungen .....	29
4.7.2	Bestimmung der Glutaminkonzentration im Serum .....	29
4.7.3	Untersuchungen zur Beurteilung des antioxidativen Status.....	30
4.7.3.1	Messung der antioxidativen Kapazität (TEAC) .....	30
4.7.3.2	Bestimmung der Vitamin C-Konzentration im Plasma .....	31
4.7.3.3	Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Plasma .....	32
4.7.3.4	Bestimmung von GSH und GSSG im Vollblut.....	33
4.8	Statistische Auswertung .....	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
5.1	Glutaminkonzentration im Serum.....	35
5.2	Blutbild .....	36
5.3	Antioxidativer Status.....	38
5.3.1	Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) im Vollblut.....	38

5.3.2	Antioxidative Kapazität (TEAC) .....	40
5.3.3	Antioxidativ wirksame Vitamine (Vitamin C und Vitamin E).....	41
5.4	Parameter zur Beurteilung der Belastung.....	43
5.4.1	Laktatkonzentration.....	43
5.4.2	Kreatinkinase (CK) .....	44
5.4.3	Weitere ausgewählte klinisch-chemische Parameter .....	45
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
6.1	Glutamin .....	46
6.1.1	Dosierung von Glutamin .....	46
6.1.2	Applikationsart und Verträglichkeit von Glutamin .....	46
6.1.3	Glutaminkonzentration im Blut in Abhängigkeit von der Supplementierung und dem Grasbahntraining .....	48
6.2	Einfluss des Glutamins auf den antioxidativen Status .....	49
6.2.1	Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) im Vollblut.....	49
6.2.2	Antioxidative Kapazität (TEAC), Vitamin C und Vitamin E .....	50
6.3	Parameter zur Beurteilung der physischen Belastung.....	52
6.3.1	Laktat als Nachweis der Belastungsintensität.....	52
6.3.2	Kreatinkinase als Nachweis von Belastungsschäden.....	53
6.4	Kritische Beurteilung .....	54
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

---

K	Kontrollgruppe
G	Glutaminsupplementierte Gruppe
vw	Vorwert
vT	Zeitpunkt der Probennahme vor dem Training
nT1	Zeitpunkt der Probennahme direkt nach dem Training
nT2	Zeitpunkt der Probennahme 20 Stunden nach dem Training

# 1 Einleitung

---

Starke physische Belastung resultiert sowohl bei Menschen als auch bei Tieren in einer gesteigerten Genese von Sauerstoffradikalen (Cheeseman und Slater, 1993; Ji, 1995). Untersuchungen an Galopprennpferden bestätigen, dass auch diese Tiere während eines maximalen Trainings verstärkt oxidativem Stress ausgesetzt sind, verursacht durch eine erhöhte Synthese von freien Radikalen (Jones und Linstedt, 1993).

Eine Supplementierung mit Antioxidantien verringert oxidativen Stress bei körperlicher Belastung. Durch nutritive Aufnahme von Antioxidantien kann der antioxidative Schutz des Organismus verbessert werden, und eine schnellere Regeneration von Gewebeschäden, die durch Sauerstoffradikale entstehen, ist denkbar (Snow, 1990).

In dieser Studie soll die Wirkung der Aminosäure L-Glutamin auf den antioxidativen Status des Galopprennpferdes untersucht werden. Glutamin dient als Substrat für die Glutathionsynthese, dem wichtigsten intrazellulär wirksamen antioxidativen System, und hat zahlreiche andere positive Stoffwechselfunktionen.

Vergleichbare Studien an Pferden liegen nicht vor. Die vorliegenden Untersuchungen stellen eine Pilotstudie dar, um erste Erkenntnisse über den Einsatz von Glutamin zur Verbesserung des antioxidativen System bei Pferden zu gewinnen.

Die Supplementierung von Glutamin bei Galopprennpferden könnte vielversprechend sein. Kommt es über eine Erhöhung der Glutaminzufuhr zu einer Verbesserung des antioxidativen Schutzes besteht die Möglichkeit, durch diese nutritive Beeinflussung den oxidativen Stress und seine Folgen nach extremer physischer Belastung bei den Pferden zu reduzieren.

## 2 Literaturübersicht

---

### 2.1 Bildung von Sauerstoffradikalen bei physischer Belastung

Unter physiologischen Bedingungen werden freie Sauerstoffradikale während des normalen Zellstoffwechsels erzeugt (Halliwell und Gutteridge, 1985). Die Bildung von Sauerstoffradikalen erfolgt bei einigen Stoffwechselprozessen in der Zelle zwangsläufig. Hierzu gehören der Prozess der mitochondrialen Atmungskette sowie Detoxifikationsprozesse über das Zytochrom P-450 System der Mitochondrien, der Abbau von Purinen mittels der Xanthinoxidase (McCord, 1985) und die Arachidonsäurekaskade, in der die Enzyme Cyclooxygenase und Lipooxygenase von entscheidender Bedeutung sind. Auch im Anschluss an die Phagozytose von Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, werden Radikale gebildet (McCord, 1993). Unter physiologischen Bedingungen wird der Organismus durch ein vielseitiges antioxidatives Schutzsystem vor Angriffen durch aktive Sauerstoffstufen geschützt. Die Entwicklung dieser Schutzsysteme stellten während der Evolution in der sauerstoffreichen Atmosphäre einen Selektionsvorteil dar (Stohrer et al., 2002). Werden zu viele und/oder zu lange freie Radikale gebildet, versagen die Schutzmaßnahmen des antioxidativen Systems. Es entsteht eine Imbalance zwischen dem Auftreten von freien Radikalen und den antioxidativen antiradikalischen Schutzmaßnahmen. Diesen Zustand nennt man oxidativen Stress (Viguie, 1993; Halliwell, 1997; Ohlenschläger, 2000). Die nun im Einzelnen beschriebenen Mechanismen stehen in direktem Zusammenhang mit der Synthese einer hohen Anzahl von freien Radikalen und der Entstehung von oxidativem Stress während einer starken physischen Belastung des Organismus.

Davies et al. (1982) wiesen nach, dass eine starke physische Belastung in einer verminderten mitochondrialen Atmung resultiert, es zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen kommt und erhöhte Konzentrationen an Lipidperoxid-Produkten gebildet werden. Die Hauptursache dieser vermehrten Bildung freier Radikale während physischer Anstrengung liegt in der Bildung von  $O_2^*$  aus  $O_2$  innerhalb der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien (Jenkins, 1988; Sjodin et al., 1990).



Alle vielzelligen lebenden Systeme nutzen den atmosphärischen, molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) als Oxidans, als Elektronenakzeptor im Rahmen der biologischen Oxidation in den Mitochondrien der Zellen zur Gewinnung ausreichender Wachstums-, Differenzierungs- und Lebensenergie, die in Form energiereicher Phosphate (ATP, GTP u.a.) gespeichert wird. Diese lebenswichtige Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen, sorgfältig kontrolliert in mehreren Zwischenstufen, in den Mitochondrien ab. Von NADH, Sukzinat und anderen Elektronendonatoren werden Elektronen über mehrere Redoxkomplexe auf Sauerstoff übertragen, wobei schließlich Wasser entsteht. Etwa 3% des Elektronentransfers kann dabei zur Bildung von Sauerstoffradikalen ( $O_2^*$ ), und anderen reaktiven Sauerstoffprodukten (z. B.  $H_2O_2$ ) führen (Boveris et al., 1975). Nur 2-4% der freigesetzten Radikale gelangen ins Zytosol und werden dort von weiteren antioxidativen Schutzsystemen abgefangen. Bei maximaler Muskelarbeit nimmt der Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien bis auf das 100fache des Ruhewertes zu. Die parallel vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen ins Zytosol übersteigt dann leicht die Kapazität der antioxidativen Systeme und verursacht oxidativen Stress (Davies et al., 1982; Chandan, 1995).

Der Abbau von Purinen über das Enzym Xanthinoxidase stellt, im Verlauf einer Ischämie und Reperfusion, eine weitere Quelle für die Entstehung von Sauerstoffradikalen, insbesondere nach physischer Belastung, dar. Barclay et al. (1991) stellten einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktivität der Xanthinoxidase und der Ermüdung der Skelettmuskulatur fest. Durch den ischämiebedingten Energiemangel während maximaler Muskelarbeit, wird die Synthese von ATP gestört, worauf durch Nukleotid- Abbau Adenosin Monophosphat (AMP), Adenosin, Inosin und Hypoxanthin gebildet werden. Durch die Ischämie wird die Umwandlung des Enzyms Xanthindehydrogenase, das besonders in den Mikrogefäßen lokalisiert ist und Elektronen auf  $NAD^+$  überträgt, in die Xanthinoxidase Form induziert. Im Verlauf der Reoxygenierung katalysiert das Enzym Xanthinoxidase erst die Entstehung von Xanthin aus Hypoxanthin und dann die Bildung von Harnsäure, wobei es Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff transferiert und Sauerstoffradikale gebildet werden (Kelly, 1993; Gürke et al., 1995). Eine Erhöhung von Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure im Blut von Rennpferden wurde nach unterschiedlichen physischen Belastungen gemessen (Mills et al., 1996).

Bei einer Überanstrengung der Skelettmuskulatur, verursacht durch ein „overtraining“, kommt es zu Schäden in den Muskelzellen, die nach der physischen Belastung regeneriert werden müssen. Die Antwort des Organismus auf diese Strukturveränderungen in den Muskelzellen kann auch als akute Entzündungsreaktion beschrieben werden (Evans et al., 1991; Smith, 1991). Diese Reaktion beinhaltet unter vielen anderen Reaktionen die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Muskelzelle (Belcastro et al., 1996). Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, und Makrophagen sind zur Phagozytose befähigt. Nach deren Aktivierung werden  $\text{OH}^*$ -Radikale, Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sowie Superoxid ( $\text{O}_2^*$ ) über die membrangebundene NADPH-Oxidase unter hohem Sauerstoffverbrauch erzeugt. Dieser Vorgang wird als „respiratory burst“ bezeichnet. Aus dem freigesetzten Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) wird in Anwesenheit von Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ), katalysiert durch die Myeloperoxidase, hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ) gebildet. Neben der Abtötung von Bakterien können die produzierten Sauerstoffradikale mit anderen Zellstrukturen reagieren und diese schädigen (McCord, 1993). In der Muskelzelle wurde aufgrund der Reaktion von Zellstrukturen mit diesen Radikalen ein Integritätsverlust der Muskelzellmembran festgestellt (Ebbeling et al., 1989).

## **2.2 Bedeutung von Sauerstoffradikalen bei physischer Belastung**

Freie Radikale sind Moleküle oder Ionen, die ein ungepaartes Elektron enthalten, und in der Regel eine hohe Reaktivität zeigen. Die häufigsten Sauerstoffradikale sind das Superoxidanion ( $\text{O}_2^*$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das hochreaktive Hydroxylradikal ( $\text{OH}^*$ ) und der Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Radikale können sofort mit Membranlipiden, Proteinen und Nukleinsäuren reagieren. Besonders gravierend ist die tumoröse Entartung des Gewebes infolge von oxidativen Veränderungen und Schädigungen an Nukleosiden und Nukleotiden, also an DNA-/RNA-Strukturen und den damit verbundenen Veränderungen, wie zum Beispiel Auslöschungen biologischer Informationen und genetischer Grundregulationen (Ohlenschläger, 2000).

Akute Schäden, wie sie bei extremer physischer Belastung auftreten, beruhen im wesentlichen auf einer Reaktion der Sauerstoffradikale mit ungesättigten Fettsäuren in Zellmembranen (Davies et al., 1982). Dies kann zum Verlust der Zellintegrität und zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile führen (Halliwell und Chirico, 1993). Eine verstärkte Bildung

von Lipidperoxydationsprodukten ist folglich nach starker physischer Belastung bei verschiedenen Spezies nachzuweisen (Brady et al., 1978; Davies et al., 1982; Salminen et al., 1983; Lovlin et al., 1987; Sen et al., 1994; Mills et al., 1996; Leaf et al., 1997; Chiaradia et al., 1998).

In der Skelettmuskulatur wurde, verursacht durch oxidativen Stress, eine Herabsetzung der muskulären Kontraktilität festgestellt (Jacinto und Jandhyala, 1994).

**Tab. 1 : Nachweis der Lipidperoxydation nach physischer Belastung bei verschiedenen Spezies (Stohrer et al., 2002).**

**MDA:** Malondialdehyd, entsteht aus Membranlipiden durch Angriff von Sauerstoffradikalen.  
**GSH:** reduziertes Glutathion (siehe Text).  
**GSSG:** oxidiertes Glutathion (siehe Text).  
**T-GSH:** Gesamtglutathion (Summe aus GSH und GSSG).  
**Pentan, Äthan:** entsteht aus Membranlipiden durch Angriff von Sauerstoffradikalen.

Modell	Belastung	Messparameter	Probenmaterial	Literatur
Maus	Laufband	↑ MDA	Muskel	Salmine et al., 1983
Ratte	Laufband	↑ MDA, GSSG/T-GSH	Muskel, Herz, Plasma	Sen et al., 1994
Ratte	Laufband	↑ MDA	Muskel, Leber	Davies et al., 1982
Pferd	Laufband	↑ Lipidperoxide, Hypoxanthin	Plasma	Mills et al., 1996
Pferd	Training	↑ MDA, T-GSH	Plasma	Chiaradia et al., 1998
Pferd	Training	↑ MDA	Erythrozyten	Brady et al., 1978
Mensch	Laufband	↑ Pentan, Äthan	Atemluft	Leaf et al., 1997
Mensch	Ergometer	↑ MDA, T-GSH, GSSG/T-GSH	Plasma	Sen et al., 1994
Mensch	Ergometer	↑ MDA, GSSG	Plasma	Lovlin et al., 1987

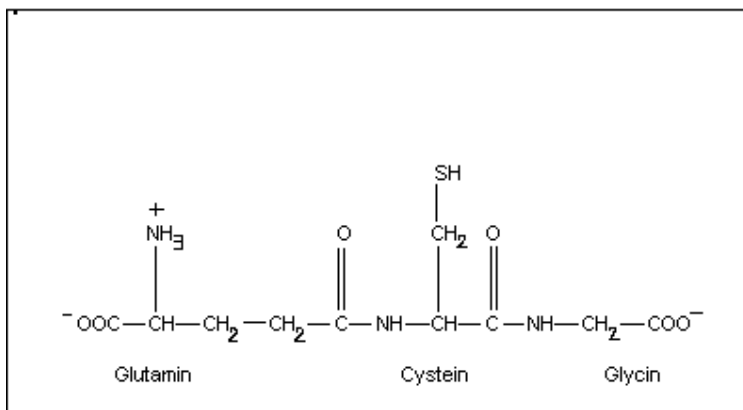
### **2.3 Vorkommen von Antioxidantien**

Der lebende Organismus verfügt über eine Vielzahl von antioxidativ wirksamen Substanzen, die entweder vom Körper selbst synthetisiert werden oder exogen über die Nahrung aufgenommen werden (Sen et al., 1994).

Antioxidantien werden Verbindungen genannt, die selbst oxidiert werden und damit andere Substanzen vor der Oxidation bewahren können (Sen, 1995). Fast alle Bestandteile der Zelle, wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren müssen vor Oxidation geschützt werden.

Die Antioxidantien werden in zwei große Gruppen unterteilt. Dabei unterscheidet man enzymatisch wirksame Antioxidantien, wie die Superoxidismutase, die Glutathionperoxidase und die Catalase, von den nicht enzymatischen Antioxidantien (Halliwell und Gutteridge, 1990; Chow, 1991; Michiels et al., 1994). Zu dieser großen Gruppe werden die Vitamine, wie Vitamin C und Vitamin E, andere Naturstoffe, wie Flavonoide und Tannine, gezählt. Weiterhin gehören organische Moleküle wie Harnsäure, L-Cystein, L-Methionin, Liponsäure und das reduzierte Glutathion zu den nicht enzymatischen Antioxidantien. Darüber hinaus können bestimmte synthetische Stoffe und Arzneimittel antioxidativ wirksam sein (Ohlenschläger, 2000).

## 2.4 Stoffwechsel und Wirkung von Glutathion



**Abb. 1: Strukturformel des Tripeptids  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin in der reduzierten Form**

Im Zentrum des komplexen Schutzsystems vor freien Radikalen gegen oxidativen Stress steht die körpereigene Substanz, das Glutathion, als reduziertes Glutathion (GSH; Elstner, 1990). Glutathion ist das prominenteste zelluläre Thiol in allen Geweben (Meister und Anderson, 1984). Es handelt sich um ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutamat dessen  $\gamma$ -Carboxylgruppe die Peptidbindung eingeht. GSH erreicht eine relativ hohe intrazelluläre Konzentration von 0,5 - 10 mmol/l und liegt in der Zelle als reduziertes GSH, oxidiertes GSH (GSSG) oder in Form von gemischten Disulfiden vor, wobei intrazellulär der größte Anteil als reduziertes GSH vorliegt (Ohlenschläger, 2000).

Die Funktionen von GSH in verschiedenen reduzierenden Stoffwechselprozessen sind vielseitig. GSH hält in allen biologischen Kompartimenten das physiologische Redoxmilieu über das regulierende Redoxsystem GSH--gemischte Disulfide--GSSG aufrecht (Cotgreave and Gerdes, 1998; Dröge et al., 1998). Durch dieses so wichtige negative Redoxpotential wird eine Konformationsoptimierung und Konformationserhaltung für Proteine und Enzyme erreicht (Dolphin et al., 1989). Weiterhin ist GSH für den Aminosäuretransport über den  $\gamma$ -Glutamylzyklus wichtig (Sies, 1999). Es optimiert das Milieu und mehrere Mechanismen der Genregulation und steuert physiologisch die Apoptose (Arrigo, 1999; Sen et al., 1999). GSH bildet Chelate mit toxischen Schwermetallen, entgiftet sie und macht sie dadurch ausscheidungsfähig. Weiterhin ist GSH Partner für alle wichtigen Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen (Gilbert, 1995). Seine wichtige Wirkung als Antioxidans wird später im Einzelnen beschrieben (siehe 2.5).

Glutathion wird in fast allen Zellen des Organismus synthetisiert. Eine besonders hohe Syntheserate ist in der Leber nachgewiesen (Sies, 1999). Intrazellulär wird es über zwei ATP-abhängige Reaktionen synthetisiert. Die erste Reaktion katalysiert, über das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, die Bildung von  $\gamma$ -Glutamylcystein aus Glutamat und Cystein. In der zweiten Reaktion erfolgt die Bildung von GSH durch die GSH-Synthetase (Griffith, 1999). Dabei aktiviert ATP die Carboxylgruppe des Cysteins und ermöglicht ihr dadurch die Kondensation mit der Aminogruppe des Glycins. Die Bildungsrate von GSH wird über einen Feedback Mechanismus durch GSH selbst, welches die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase hemmt, und über die Bioverfügbarkeit seiner Substrate kontrolliert (Shan et al., 1990).

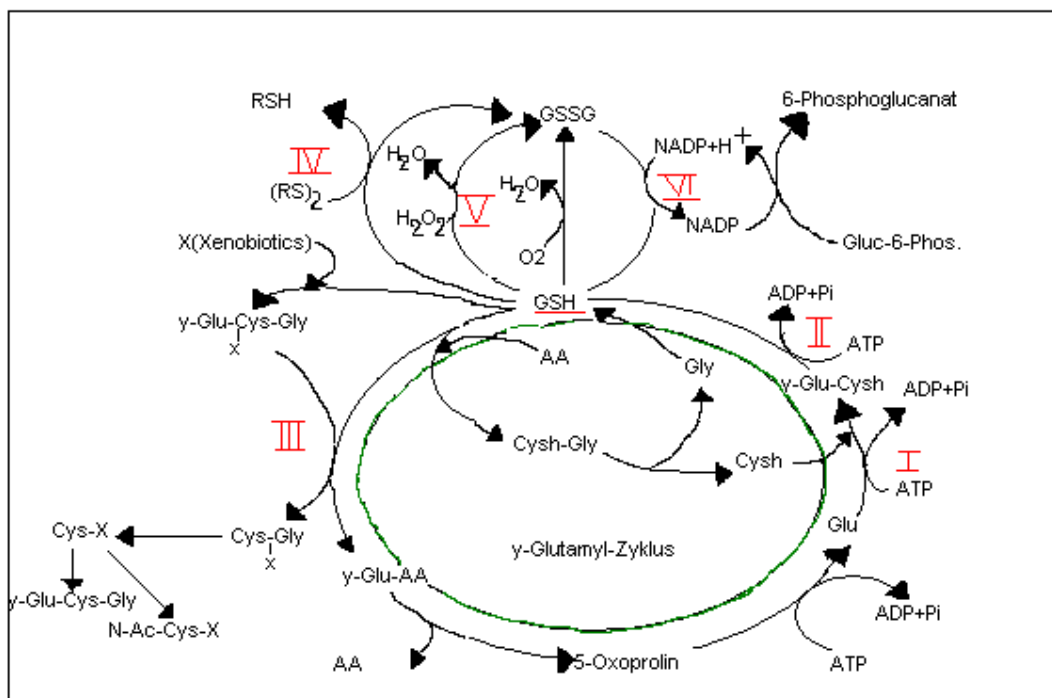
Der Abbau von GSH, oxidiertem GSH (GSSG) und S-substituiertem GSH erfolgt durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase. Das aktive Zentrum dieses Enzyms befindet sich auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Für die Reaktion findet eine Translokation des Glutathions durch die Plasmamembran statt. Das Enzym katalysiert dann den Transfer der  $\gamma$ -Glutamyl-Gruppe von GSH zu einer  $\alpha$ -Aminogruppe einer Akzeptoraminosäure, zum Beispiel Cystin oder Glutamin (Gul et al., 2000). Die  $\gamma$ -Glutamylaminosäuren werden dann von den Zellen anderer Organe aufgenommen und zu 5-Oxoprolin zyklisiert, wobei die transportierte Aminosäure freigesetzt wird. Schließlich wird die Peptidbindung des 5-Oxoprolins in einer ATP-abhängigen Reaktion, die Glutamat regeneriert, hydrolysiert. Alton Meister (1984) zeigte, dass diese Reaktionen einen  $\gamma$ -Glutamylzyklus bilden (siehe Abb. 2).

Einige Zellen besitzen die Fähigkeit, GSH aus dem Plasma direkt aufzunehmen. Dieser Vorgang erfolgt über ein  $\text{Na}^+$ -abhängiges Transportsystem (Lash und Jones, 1984; Hagen et al., 1988). Nachgewiesen wurde dieser Transportmechanismus in einer großen Anzahl von epithelialen Geweben, wie im proximalen Tubulus der Niere, in den Alveolen, im pigmentierten Epithel der Retina, in Muskelzellen und in den Enterozyten des Dünndarms (Hagen et al., 1986; Lash et al., 1986).

Der Plasmaspiegel des GSH wird in erster Linie von der Leber, dem Organ mit der höchsten GSH Syntheserate, und der Niere bestimmt (Inoue et al., 1983). Untersuchungen verschiedener Abschnitte des Blutsystems an Ratten zeigten wesentlich höhere GSH-Plasmakonzentrationen in den Lebervenen als in den Arterien (Meister, 1984). Dagegen wurden in den Venen der Nieren nur ein Gehalt von 20% des GSH gemessen im Vergleich

zu den Konzentrationen der Nierenarterien (Scott und Curthoys, 1986). Ein GSH-Export konnte außerdem in Fibroblasten (Bannai und Tsukeda, 1979) und lymphoiden Zellen nachgewiesen werden (Griffith et al., 1979).

Intrazellulär wird GSH durch die selenabhängige Glutathionperoxidase (GSHPX) zu GSSG oxidiert. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und anderen Peroxiden. GSSG kann auch über eine Transhydrogenierung gebildet werden. Die Reduzierung von GSSG erfolgt über eine GSSG-Reduktase welche Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ( $\text{NADPH}^+$ ) verbraucht. Eine Bildung von GSSG aus GSH kann aber auch direkt durch eine Reaktion von Sauerstoffradikalen mit GSH erfolgen.



**Abb.2: Glutathion Metabolismus (modifiziert nach Meister, 1984).**

- I.  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase;
- II. Glutathion-Synthetase;
- III. Glutamyl-Transpeptidase;
- IV. Transhydrogenase;
- V. Glutathion-Peroxidase;
- VI. Glutathion-Disulfid-Reduktase

## 2.5 Antioxidative Wirkung von Glutathion

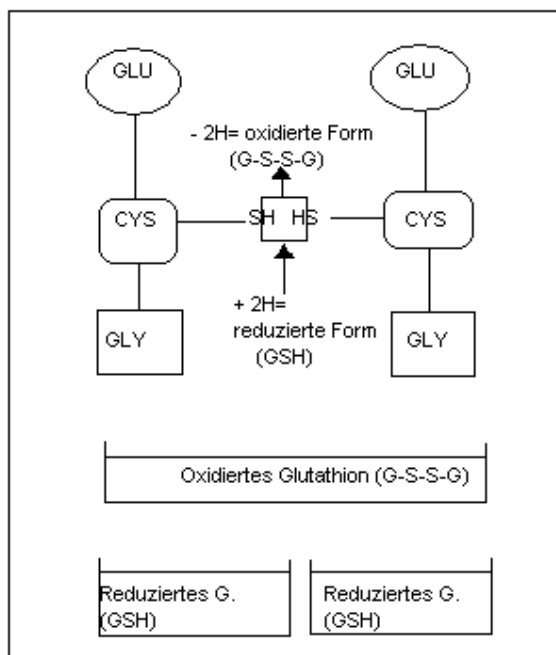
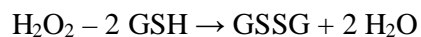


Abb. 3: Das oxidierte und reduzierte Glutathion (Ohlenschläger, 2000)

Das Glutathion-System zählt zu den wichtigsten zellulären Antioxidantien des Organismus (Hughes et al., 1990; Reed, 1990). Eine entscheidende Bedeutung für diese Funktion besitzt die Sulfhydryl (SH-) Gruppe der Cysteinyllreste, die bei physiologischem pH in undissoziiertem Zustand (pK 9,12) vorliegt. Diese SH-Gruppe wirkt als Elektronendonator.

GSH kann als Co-Faktor der selenabhängigen GSH-Peroxidasen fungieren, um  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu entgiften (Flohe et al., 1976). Dieses Enzym ist im Zytoplasma, in der mitochondrialen Matrix der Zellen (Wendel, 1980) und im Blutplasma nachgewiesen (Takahashi et al., 1988). Ein zweites Enzym, welches diese Reaktion katalysieren kann, ist die GSH-Transferase. Sie ist in hoher Konzentration in der Leber, Niere und im Darm enthalten (Burk und Lawrence, 1978).





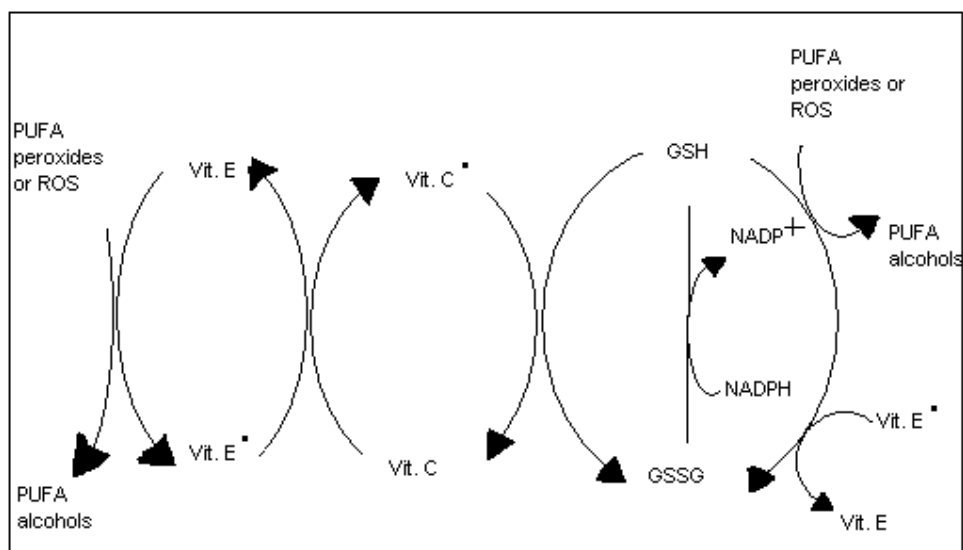
GSH kann mit fast allen im Organismus auftretenden freien Radikalen und aktivierten Sauerstoffstufen reagieren.

Mit folgenden Radikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies reagiert GSH:

- § Superoxyd-Anion-Radikal ( $O_2^*$ )
- § Perhydroxyl-Radikal ( $^*O_2H$ )
- § Wasserstoff-Peroxid ( $H_2O_2$ )
- § Hydroxyl-Radikal ( $HO^*$ )
- § Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ )
- § Ozon ( $O_3$ )
- § Lipidradikale ( $L^*$ )

Bei solchen direkten antioxidativen Reaktionen des GSH kann es selbst zu GSSG oxidiert werden (Ohlenschläger, 2000). Gebildetes GSSG wird wieder über die Glutathion- Reduktase unter NADPH-Verbrauch zu GSH reduziert.

Eine weitere wichtige antioxidative Wirkung des GSH ist die Fähigkeit des Redox-Recyclings in hydrophilen Kompartimenten (Sen et al., 1994). Im Einzelnen betrifft dies das Vitamin C, Flavonoide und Vitamin E, wenn diese durch Reaktionen mit Sauerstoffradikalen selbst zu Radikalen geworden sind (siehe Abb. 3; Gul et al., 2000). Vitamin E liegt, obwohl es ein fettlösliches Vitamin ist, mit seinem Chromanring an der Phasengrenze zwischen Membranlipiden und Membranproteinen. Dies ermöglicht, dem GSH phasenübergreifend mit dem Chromanring zu reagieren.



**Abb. 4: Zentrale Rolle des Glutathion im antioxidativen System.**

PUFA: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

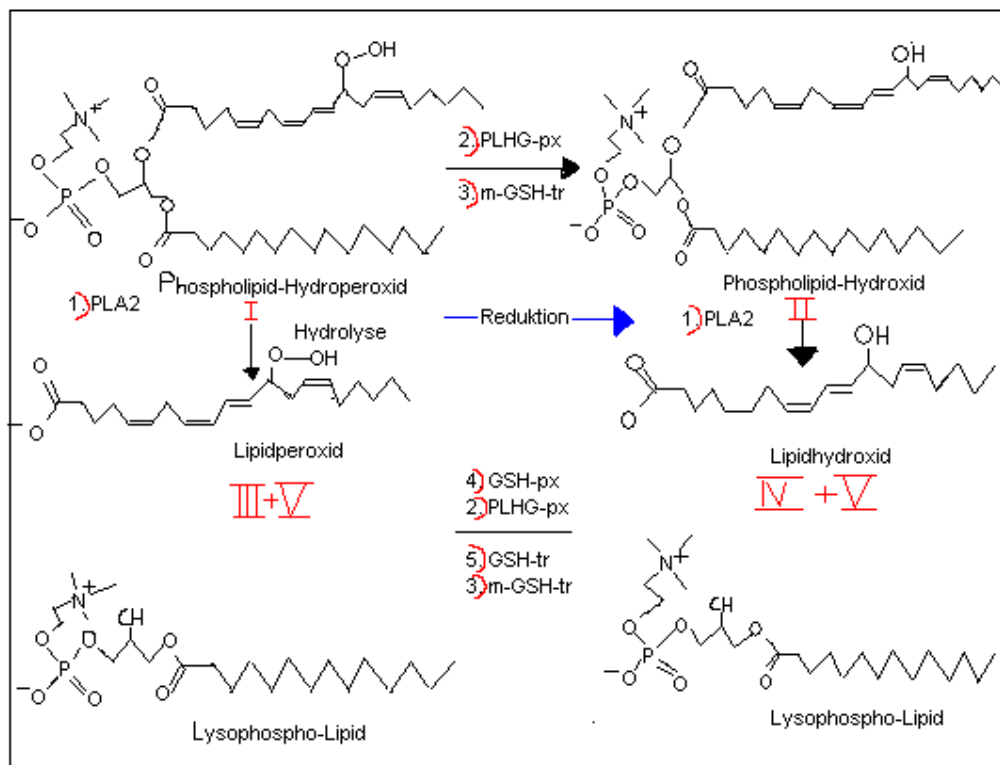
ROS: Freie Radikale (mod. Nach Gul et al., 2000)

Bei der Lipidreparatur, die ein enzymatisches Schutzsystem darstellt, sind neben nicht-enzymatischen Antioxidantien wie Vitamin E, vor allem die selenabhängigen Glutathion-Peroxidasen und GSH als Coenzym eingeschaltet (Gul et al., 2000). Folgende Enzyme und GSH sind in den komplexen Prozess der Lipidreparatur eingeschaltet:

- § PLA2 (Phospholipase A<sub>2</sub>)
- § PLHG-Px (Phospholipid-Hydroperoxid-GSH-Peroxidase, ein selenabhängiges Enzym)
- § m-GSH-tr (Mikrosomale GSH-Transferase)
- § GSH-Px (selenabhängige GSH-Peroxidase)
- § GSH-tr (Zytosolische GSH-Transferase)

Wie Abb. 5 zeigt, kann das Phospholipid-Hydroperoxid (I) durch PLHG-Px (2) oder durch mGSH-tr (3) zu dem Phospholipid-Hydroxid (II) reduziert werden. Analog kann das Lipidperoxid (III) durch GSH-Px (4), PLHG-Px (2), GSH-tr (5) und durch m-GSH-tr (3) zum

Lipidhydroxid (IV) reduziert werden. Die Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysiert sowohl Phospholipid-Hydroperoxid (I) zu Lipidperoxid (III) und Lysophospholipid (V), als auch Phospholipid-Hydroxid (II) zu Lipidhydroxid (IV) und Lysophospho-Lipid (V). Zytotoxische Aldehyde, die als Bruchstücke ungesättigter Fettsäuren bei der Lipidperoxidation entstehen können, werden durch die GSH-Transferasen und durch GSH selbst detoxifiziert (Ohlenschläger, 2000).



**Abb. 5:** Die in die Lipidperoxidation eingeschalteten Schutzenzyme (Mod. nach Ohlenschläger, 2000)

## 2.6 Bedeutung von Glutathion bei physischer Belastung

Starke physische Belastung führt zu einem erhöhten  $O_2$ -Konsum. Dieser steigt beim Pferd bis auf einen 30-fachen Wert an und verursacht eine erhöhte Produktion an freien Radikalen mit verstärkter daraus resultierender Peroxidation von Lipiden (Butler et al., 1993).

Physische Belastung kann infolge einer starken Erhöhung des Sauerstoff-Konsums oxidativen Stress verursachen (Liu et al., 2000). Oxidativer Stress wird auch definiert als ein Zustand, in dem der Organismus sein physiologisches GSH/GSSG Verhältnis nicht mehr aufrechterhalten kann (Ji und Fu, 1992; Reed, 1990) oder die Konzentration an GSSG stark ansteigt (Hughes et al., 1990). Eine Verminderung des intrazellulären GSH/GSSG Redox-Potentials stellt einen sensiblen Indikator für oxidativen Stress dar (Hughes et al., 1990; Neu et al., 1997).

Extreme physische Belastung ruft einen starken Anstieg von GSSG im Blut und in der Skelettmuskulatur beim Menschen hervor (Lew et al., 1985; Gohil et al., 1988; Sahlin et al., 1991; Ji und Fu, 1992). Ähnliche Messungen wurden auch bei Rennpferden durchgeführt (Chiaradia et al., 1998).

GSH ist essentiell für den Schutz vor Lipidperoxidation in den Mitochondrien, da diese nur eine geringe Aktivität der Catalase zeigen (Sen et al., 1994). Kommt es zu oxidativem Stress, erfolgt intrazellulär die Oxidation von GSH zu GSSG. Das gebildete GSSG kann wieder über die GSH-Reduktase, in Anwesenheit von NADPH, zu GSH reduziert werden. In einer extremen Stoffwechselsituation wird die Kapazität der Zelle, GSSG zu reduzieren, überstiegen und es kommt zu einem Anstieg der GSSG-Konzentration. Dies beruht im wesentlichen auf der verminderten Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH (Ohlenschläger, 1991). Eine Erhöhung der GSSG-Konzentration und niedrigere Werte von Total-GSH (GSH + GSSG) nach starker physischer Belastung wurden im Herzen, in der Skelettmuskulatur und in der Leber festgestellt (Ji et al., 1992; Ji und Fu, 1992; Sen et al., 1992). Ist die Konzentration an GSSG zu stark angestiegen, kommt es zu einem GSSG-Efflux aus der Zelle ins Blutplasma. Ein Anstieg der GSSG-Konzentration im Plasma wurde bei Tieren nach physischer Belastung gemessen (Lew et al., 1985; Lew und Quintanilha, 1991; Sen et al., 1994).

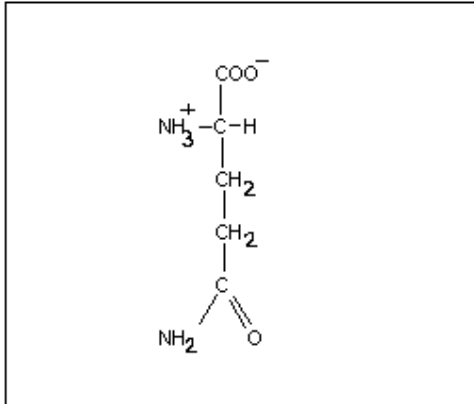
Die GSH-Syntheserate der Leber ist sehr hoch. Trotzdem konnte nach physischer Belastung auch in diesem Organ ein Abfall des GSH gefunden werden.

Verursacht durch oxidativen Stress kommt es zu einem Efflux von GSH aus der Leber, welches dann anderen Organen, mit einer geringeren GSH-Syntheserate zur Verfügung steht. Der Export von GSH aus der Leber wurde als protektive Antwort auf oxidativen Stress beschrieben (Sen et al., 1992). Studien an hepatektomierten Ratten zeigten, dass die GSH-Konzentration des Herzens bei oxidativem Stress auf den Leber-GSH-Efflux angewiesen ist (Kretzschmar et al., 1992).

Ein Abfall der GSH-Konzentration führt zu einer verstärkten Schädigung des Gewebes, durch freie Radikale. Folgen sind ein Strukturverlust der Membranen und intrazellulärer Enzyme (Halliwell und Gutteridge, 1989). Eine exogene Zufütterung von GSH konnte zwar keine Veränderung der Ausdauer bei einer extremen Anstrengung von zwei Stunden zeigen (Sen et al., 1994), allerdings war der in anderen Studien zu messende Efflux des antioxidativ wirkenden Enzyms Superoxid-Dismutase aus den Mitochondrien ins Plasma geringer und ein Aktivitätsabfall von GSH-PX vermindert.

NAC (2-mercapto-propionyl Glycin) wirkt als Promotor der GSH-Synthese durch Bereitstellung von Cystein. Nach oraler Gabe von NAC konnte, infolge physischer Belastung, eine verminderte GSH-Oxidation festgestellt werden (Sen et al., 1994). Diese Ergebnisse zeigen, dass das GSH-System eine wichtige Schutzfunktion bei körperlicher Anstrengung darstellt.

## 2.7 Stoffwechsel und Wirkung von L- Glutamin



**Abb. 6: L-Glutamin (Gln.)**

Bei der Aminosäure L-Glutamin handelt es sich um eine glucogene Aminosäure, die in der Literatur den „nicht essentiellen“ Aminosäuren zugeteilt wird. Der Anteil an freien Aminosäuren in der Muskelzelle wird zu 50% von Glutamin gestellt, im Plasma beträgt er 20% und in der Leber nur 15% (Roth et al., 1990; Smith und Panico, 1985).

In der Regulierung der Glutaminkonzentration des Organismus kommt der Skelettmuskulatur durch ihre hohe Syntheserate eine besonders wichtige Bedeutung zu.

Glutamin spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Stoffwechselprozessen. Die Glutaminsynthetase ist in einer Vielzahl von Geweben wie Gehirn, Muskulatur und Nieren sowie Leber nachweisbar. Das durch Aminierung aus Glutamat gebildete Glutamin wirkt vor allem als Aminogruppendonator mit Hilfe von Glutaminamidotransferasen bei der Biosynthese von Proteinen, Purinen, Pyrimidinen und anderen Aminosäuren (Nurjhan et al., 1995; Welbourne, 1987). In der Niere besitzt es eine Funktion als Ammoniakquelle bei der Säure-Basen-Regulation und als Ammoniaktransportstoff von peripheren Organen (Gehirn, Muskulatur) zur Leber und zum Gastrointestinaltrakt. In der Leber wirkt es als Substrat für die Gluconeogenese (Ross et al., 1967). Für Zellen mit hoher Proliferationsrate, wie Darmzellen (Windmüller, 1982) und aktivierten Lymphozyten (Newsholme et al., 1985), stellt Glutamin eine wichtige Energiequelle für deren Teilung dar. Nachgewiesen wurden außerdem regulatorische Funktionen. Glutamin erhöht die Proteinbiosynthese (Jepson et al.,

1988) und vermindert den Proteinabbau in der Skelettmuskulatur (McLennon et al., 1987). Seine Rolle als Substrat bei der Glutathion Synthese wird später genau beschrieben (siehe 2.8).

Der Abbau von Glutamin erfolgt erst durch hydrolytische Spaltung in Glutamat und Ammoniak. Die Reaktion wird durch das Enzym Glutaminase katalysiert. Anschließend erfolgt die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat durch eine Transaminierung des Glutamates.

Exogen zugeführtes Glutamin wird über ein natriumabhängiges Transportsystem im Bürstensaum des Darmes aufgenommen. Die Menge an Glutamin, welches das Portal-Blut erreicht, ist abhängig von der zugeführten Konzentration (Souba et al., 1990). Darmzellen weisen eine hohe Aktivität der phosphatabhängigen Glutaminase auf (Windmueller, 1982). Dieses Enzym ist an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert und wird aktiviert durch Glucokortikoide (Fox et al., 1988), Glukagon (Geer et al., 1988) und die zugeführte Nahrung (Salloum et al., 1989). Es spaltet den Kohlenstoff in Kohlendioxid und Stickstoff in Ammoniak (38%), Zitrullin (28%), Alanin (24%) und Prolin (7%) (Windmueller, 1982; Windmueller und Spaeth, 1980). Bei einer zugeführten Konzentration von 6 mmol/l Glutamin wurden nur ein Drittel des Glutamins dem venösen Blut zugeführt. Bei einer zugeführten Konzentration von 45 mmol/l konnten jedoch mehr als zwei Drittel des Glutamins im venösen Blut nachgewiesen werden (Windmueller und Spaeth, 1980).

Hauptreservoir und Regulator der Glutamin-Homeostase bildet die Skelettmuskulatur (Griffiths, 2001). Glutamin wird in hohen Raten synthetisiert und dann ins Plasma transportiert, um anderen Organen mit einer niedrigeren Syntheserate zur Verfügung zu stehen.

Die erste Reaktion eines Organismus auf Trauma, operative Eingriffe, andere katabole Stoffwechsellagen und extrem langanhaltende physische Belastung, ist der Export von Glutamin aus der Muskulatur in das Plasma (Smith und Wilmore, 1990). Daraus resultiert ein verstärkter Proteinabbau und eine „de novo“-Synthese von Glutamin aus den freigesetzten Aminosäuren. Extreme Stoffwechsellagen können die Kapazität zur „de novo“-Synthese übersteigen. Es kommt dann zu einem rapiden Abfall des Glutamins im Plasma und Gewebe (Askanazi et al., 1980; Gore und Jahoor, 2000).

Mehrere Untersuchungen des Glutamin-Stoffwechsels belegten einen drastischen Abfall der Glutamin-Konzentration sowohl im Plasma als auch in einzelnen Geweben, in katabolen Stoffwechsellagen (Muelbacher et al., 1984; Souba et al., 1990).

Nachdem exogen supplementiertes Glutamin positive und anabolische Effekte in Studien an Tieren (Karner et al., 1984; Roth et al., 1990) und an gesunden sowie kranken Menschen (Roth et al., 1985) zeigte, wird die Klassifizierung von Glutamin als eine „nicht-essentielle“ Aminosäure von vielen Autoren kritisiert (Roth et al., 1990; Smith et al., 1990; Souba et al., 1990). Vielmehr sollte Glutamin in die Kategorie der „conditionally essential“ Aminosäuren eingestuft werden.

## **2.8 Wirkung von Glutamin auf das Glutathion-System und seine Bedeutung**

L-Glutamin spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Glutathion (Harward et al., 1994).

Das Tripeptid Glutathion wird aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet. Im Gegensatz zu Glutamat, wird Glutamin leicht durch die Zellmembranen transportiert und bildet dadurch einen leicht verfügbaren Baustein für die Synthese von Glutathion (Hong et al., 1991; Giffiths, 2001; Mates et al., 2001). Der Einbau von Glutaminresten in das Tripeptid Glutathion wurde in Nierenzellen in zwei in vitro Studien belegt (Cook und Peters, 1986; Hong et al., 1991). Denno et al. (1996) bewiesen mit einer in vivo Studie an Ratten, dass die parenterale Gabe von Glutamin eine Erhöhung des Plasma GSH-Spiegels bewirken kann. Eine andere Untersuchung an Ratten in einem Ischämie/Reperfusion-Modell zeigte einen verminderten Abfall des Leber- und Darm-Glutathion-Spiegels in einer glutaminsupplementierten Gruppe (Harward et al., 1994). Prem et al. (1999) belegten in einem anderen Ischämie/Reperfusion-Versuch an Ratten, dass eine Glutamin-Supplementierung den Abfall des Muskel-GSH reduziert. Zusätzlich wurde eine verminderte Aktivität der Kreatinphosphokinase und eine geringere Konzentration von Lipidperoxiden gemessen, die auf eine verminderte Gewebeschädigung, verursacht durch freie Radikale, schließen lässt (Ahmad et al.; 2001).

Ein drastischer Abfall des Muskel- und Plasma-Glutaminspiegels, wie er in bestimmten katabolen Stoffwechselsituationen erfolgt, korreliert direkt mit einer verminderten Glu-



tathion-Konzentration in Muskelzellen des Organismus (Hammerqvist et al., 1997). Dies wurde auch bei verschiedenen Hochleistungssportlern im Anschluss an eine extrem, langandauernde physische Belastung festgestellt (Parry-Billings et al., 1990; Newsholme, 1994).

### 3 Zielsetzung

---

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Hypothese zu prüfen, dass durch orale Supplementierung von Glutamin die Konzentration des intrazellulär wirksamen Antioxidans Glutathion erhöht werden kann und dadurch oxidativer Stress abgemildert wird.

Um die protektive Wirkung von Glutamin auf den antioxidativen Status zu untersuchen, wurde geplant, Hürdenrennpferden, die in vollem Training stehen und damit extremer physischer Belastung ausgesetzt sind, diese Aminosäure über das Futter zu supplementieren.

Die Pferde wurden in eine glutaminsupplementierte- und eine Kontrollgruppe eingeteilt.

Untersucht wurden Parameter zur Beurteilung des antioxidativen Status (GSH und GSSG, TEAC, Vitamin E, Vitamin C), und Parameter für Gewebeschäden, die auf eine Muskel- und Leberbelastung und eventuelle Nebenwirkungen hinweisen (Enzymaktivitäten der muskel- und leberspezifischen Enzyme, andere ausgewählte Parameter und das Blutbild).

## **4 Material und Methoden**

---

### **4.1 Versuchstiere**

Für die Studie standen 20 Hürdenrennpferde der Rasse englisches Vollblut zur Verfügung. Alle Pferde waren während des Versuchszeitraums an der Galopprennbahn Merano-Maia in Meran/Italien in demselben Rennstall untergebracht.

Sieben Pferde schieden aus folgenden Gründen aus: Bei vier Pferden konnte aufgrund schlechten Fressverhaltens kein Anstieg der Glutaminkonzentration im Serum gemessen werden, so dass diese aus der Statistik ausgeschlossen wurden. Drei weitere Pferde wurden in die Messungen nicht miteinbezogen. Sie wurden aufgrund von Leistungsschwäche und Lahmheit, nach Anordnung des Trainers, nur langsam und für die Studie nicht ausreichend trainiert.

Insgesamt haben 13 verschiedene Pferde an der Untersuchung teilgenommen. Dabei handelte es sich um drei Stuten und zehn Wallache im Alter zwischen drei und acht Jahren. Zwei der 13 Pferde wurden erst in der Kontrollgruppe eingesetzt und später in der glutaminsupplementierten Gruppe untersucht. Insgesamt wurden also 15 verschiedene Versuchsdurchgänge durchgeführt. Sieben Pferde gehörten der glutaminsupplementierten Gruppe, und acht Pferde der Kontrollgruppe an.

Die Studie erstreckte sich von September bis Mitte November 2003.

### **4.2 Haltung, Fütterung und Training**

Die Pferde waren alle in einem Stallgebäude an der Galopprennbahn von Meran aufgestallt. Alle Pferde standen auf Stroheinstreu.

Die reguläre Fütterung bestand darin, dass den Pferden morgens lediglich Heu angeboten wurde und sie mittags sowie abends zusätzlich Hafer und Müsli erhielten. Die Menge des Kraftfutters richtete sich nach der Trainingsphase und Leistung, war jedoch bei allen Pferden annähernd gleich. Trinkwasser war ad libitum zugänglich.

Alle Tiere wurden einem täglichen Training auf der Sandbahn unterzogen, dem sich bei ausgewählten Pferden einmal pro Woche ein Grasbahntraining anschloss. In dieser Studie

wurden die Auswirkungen dieses Grasbahntrainings auf den oxidativen Stress untersucht. Die später beschriebenen Probennahmen erfolgten vor (vT) und nach (nT) diesem Grasbahntraining.

Beim täglichen Training wurden die Pferde von unterschiedlichen Reitern nach Weisung des Trainers auf der Sandtrainingsbahn erst im Trab und anschließend im Galopp trainiert. Die Länge der Sandtrainingsbahn betrug 2500 Meter.

Im Anschluss an das Galopp-Training erfolgte eine „Abarbeitungsphase“. Dabei wurden die Pferde noch einmal ca. 10 Minuten auf einer Sandbahn im Trab geritten.

Beim Grasbahntraining handelte es sich um ein intensiveres Trainingsprogramm auf der Grasbahn, bei dem die Pferde mit verstärkter Geschwindigkeit über Hindernisse geritten wurden. Die Länge der Grastrainingbahn betrug 3000 Meter. Die physische Belastung war wesentlich stärker als beim normalen Training.

### **4.3 Versuchsanordnung und Glutaminsupplementierung**

Die Pferde wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. In der Gruppe des Kontrollversuchs (K) erhielten die Tiere kein Glutamin vor dem Grasbahntraining. Das Futter der Pferde aus der Glutamingruppe (G) wurde über vier Tage vor dem nächsten Grasbahntraining und am Tag des Trainings täglich mit 20 g Glutamin/100 kg KGW supplementiert.

Das Gewicht der Pferde wurde auf der stalleigenen Waage ermittelt.

Die tägliche Menge an Glutamin wurde auf zwei Portionen verteilt. Somit erhielten die Pferde am Mittag und am Abend jeweils 10 g/100 kg KGW.

Zwei Pferde wurden in zwei Messperioden einbezogen. Dabei wurde erst der Kontrollversuch (K), und nach einer mindestens zweiwöchigen Wartezeit der Glutaminversuch durchgeführt. Das L-Glutamin (Art. Nr. 8710620702, Fa. Dolder, Schweiz) wurde der täglichen Kraftfutter-Ration untergemischt. Es handelte sich um ein weißes, geschmacksneutrales und geruchloses Pulver.

#### **4.4 Probennahme**

Allen Versuchstieren (K und G) wurden innerhalb einer Messperiode, vier Blutproben entnommen.

Der Vorwert (vw), also die erste Probenahme, wurde vier Tage vor dem nächsten Grasbahntraining entnommen. Das Blut wurde am Morgen vor dem Aufsatteln gewonnen. Die Tiere hatten zu diesem Zeitpunkt seit dem Vorabend kein Kraftfutter erhalten. Pferden der Glutamingruppe wurde am Mittag desselben Tages die erste Glutaminration gefüttert.

Vier Tage später, am Morgen des Grasbahntrainings, erfolgte die zweite Blutentnahme, auch hier wurde das Blut vor dem Training entnommen (vT). Pferde der Glutamingruppe erhielten seit vier Tagen Glutamin.

Die dritte Probennahme wurde im direkten Anschluss an das Grasbahntraining durchgeführt (nT1).

Die Entnahme des Blutes war erst 30 Minuten nach Beendigung des Trainings möglich, da die Pferde erst dann wieder im Stallgelände zur Verfügung standen.

Die vierte Probennahme erfolgte ca. 20 Stunden nach dem Grasbahntraining am darauffolgenden Morgen (nT2), wiederum vor dem Training und der Kraftfuttergabe.

#### **4.5 Entnahme und Handhabung der Blutproben**

Die Blutproben wurden aus der Vena jugulares externa nach Hautdesinfektion (2-Propanol 70%, Heiland) entnommen. Nach Stauung der V. jugulares durch Fingerdruck im mittleren Drittel des Halses erfolgte die Venenpunktion mit einer sterilen Einmalinjektionskanüle (S-Monovette®-Kanüle 21Gx1 1/2, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Das Blut wurde mit einem Blutentnahmesystem (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) entnommen.

Das gewonnene Blut wurde innerhalb von fünf Minuten nach der Probennahme in die 200 Meter entfernte Pferdeklunik der Rennbahn Meran gebracht. Die Blutbilder wurden in der Pferdeklunik sofort gemessen.

Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Proben fünf Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert (Heraeus Sepatech® Zentrifuge). Das Plasma wurde anschließend in die vorbereiteten und beschrifteten Eppendorf-Cups pipettiert.

Die Serum-Monovetten wurden 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde in die vorbereiteten und beschrifteten Eppendorf-Cups pipettiert.

Die Serum- und Plasmaproben wurden mit Eis gekühlt in das städtische Krankenhaus von Meran transportiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der Transport von Italien nach München erfolgte unter Kühlung mit Trockeneis. So konnte eine Unterbrechung der Kühlkette vermieden werden.

#### **4.6 Fixierung der Vollblut-Proben zur GSH/GSSG Analyse**

In Vorversuchen wurde erarbeitet, dass die optimale Stabilität von GSH durch sofortige Fixierung mit 5%iger Sulfosalicylsäure (Blut + SSA: 1 + 3) erreicht wurde. Da bei genauer Volumenabmessung mit der Pipette eine Verfälschung der Proben durch Entmischung des Blutes (Absinken der Erythrozyten) fast unvermeidlich wäre, wurde das Mischungsverhältnis durch Abschätzen des Blutvolumens und sofortiges Zufügen der SSA eingestellt. Das genaue Mischungsverhältnis wurde über das Wiegen der Monovetten vor und nach der Probennahme ermittelt und für die spätere Auswertung berücksichtigt.

Das Vollblut-SSA-Gemisch wurde in vorbereitete Eppendorf-Cups pipettiert und eingefroren.

## **4.7 Bestimmungsmethoden**

### **4.7.1 Blutbild und klinisch-chemische Untersuchungen**

#### ***4.7.1.1 Blutbild***

Blutbilder wurden nur zu den Zeitpunkten vw und nT1 bestimmt. Die EDTA-Blutproben wurden in einem Cell-Dyn® 3500R Automaten (Fa. Abbott) der Pferdeklinik in Meran analysiert.

Folgende Blutparameter wurden bestimmt bzw. berechnet:

Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH), mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC), Thrombozyten, Leukozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

#### ***4.7.1.2 Klinisch-chemische Untersuchungen***

Die Enzymaktivitäten von Aspartat-Amino-Transferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Kreatinkinase (CK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) sowie die Parameter Kreatinin, Gesamtbilirubin, Blutharnstoff und Gesamteiweiß wurden aus Serumproben gemessen.

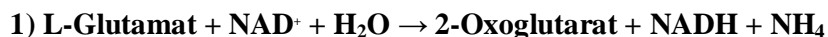
Laktat wurde aus dem gewonnenen FI-EDTA Plasma analysiert. Die Analysen erfolgten mit dem Hitachi 911 Autoanalyser (Boehringer, Mannheim, FRG) im Labor der ersten Medizinischen Tierklinik der LMU München. Dabei kamen Standard-Testkits (Boehringer, Mannheim) zum Einsatz.

### **4.7.2 Bestimmung der Glutaminkonzentration im Serum**

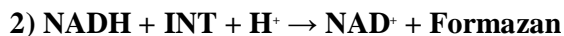
Zur Analyse von L-Glutamin wurde die nach Bergmeyer (1974) beschriebene Methode modifiziert angewendet. Dabei wurde erst das in der Probe enthaltene L-Glutamat bestimmt und danach die Konzentration von Glutamin nach Überführung in Glutamat erfasst.

Glutamat wurde über die unten beschriebenen Reaktionen (1 und 2) bestimmt.

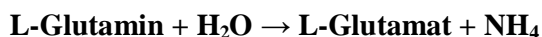
Glutaminsäure wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) oxidativ desaminiert zu 2-Oxoglutarat (1).



Das entstandene NADH setzt Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) in Gegenwart von Diaphorase zu einem Formazan (2) um, welches im sichtbaren Bereich bei 492nm gemessen wird.



Zur Bestimmung von L-Glutamin wird dieses in L-Glutamat überführt, katalysiert über das Enzym Glutaminase.



Anschließend laufen die oben beschriebenen Reaktionen 1 und 2 ab.

Verwendet wurde ein Testkit zur Bestimmung der L-Glutaminsäure (Art. Nr. 0139092, Fa. Boehringer Mannheim / R- Biopharm, Darmstadt). Das Enzym Glutaminase (Fa. Sigma®, Deisenhofen) wurde dem Reaktionsansatz zugesetzt.

### *Berechnung*

Nach der angegebenen Formel im Testkit wurden die Glutamin-Konzentrationen errechnet. Die geänderten Testvolumina und die Probenverdünnungen durch die Enteiweißung wurden dabei berücksichtigt. Die Drift der Extinktion nach abgelaufener Reaktion wurde erfasst und bei der Ermittlung der End-Extinktion abgezogen.

## **4.7.3 Untersuchungen zur Beurteilung des antioxidativen Status**

### **4.7.3.1 Messung der antioxidativen Kapazität (TEAC)**

Der antioxidative Status wurde nach der von Miller et al. (1993) beschriebenen Methode bestimmt. Die TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) erfasst die antioxidative Kapazität einer zu untersuchenden Probe. Zur Kalibrierung des Testansatzes wird Trolox eingesetzt. Das Ergebnis ist als Trolox äquivalente antioxidative Kapazität ausgedrückt.



Im Testansatz reagiert zunächst Methmyoglobin mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einem Eisenmyoglobin-Radikal. Dieses reagiert mit ABTS weiter zum chromogenen (blaugrünen) ABTS-Radikal-Kation ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), das bei 734 nm photometrisch quantifiziert wird.

In Gegenwart von Antioxidantien wird die Bildung dieses Radikals vermindert. Im Serum kommen als Antioxidantien hauptsächlich Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Bilirubin, Albumin und Harnsäure vor. Ihre antioxidative Kapazität lässt sich durch Reaktion mit dem  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikal bestimmen, indem nach Zugabe von Serum die Abnahme der Farbintensität der  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung am Photometer bei 734 nm gemessen wird.

#### ***4.7.3.2 Bestimmung der Vitamin C-Konzentration im Plasma***

Es wurde die von Schüep et al. (1984) beschriebene Methode zur Bestimmung von Ascorbinsäure in Körperflüssigkeiten, Geweben und Nahrungsmitteln modifiziert angewandt. L-Ascorbinsäure wird durch Zusatz von Jodlösung oxidiert, wobei L-Dehydro-Ascorbinsäure (DHA) entsteht. Diese bildet mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin das 2,4-Phenylhydrazon. Durch Extraktion mit Ethylacetat kann dieses Derivat quantitativ mittels high performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt werden.

#### *HPLC- Analytik*

Pumpe: Gynotek High Precision Pump Model 300 C, Flußrate: 1,5 ml/ min, Druck: ca. 60 bar.

Probengeber: Kontron HPLC Autosampler 460, Injektionsvolumen: 20  $\mu\text{l}$ , Analysezeit: 12 min.

Säule: Lichrosorb Si 60, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, Vorsäule.

Detektor: Uvikon 735 LC, Fa. Kontron Instruments, Wellenlänge 520 nm.

#### *Auswertung*

Die Proben wurden mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Microsoft®, Borwin) ausgewertet. Nach Integration der Peaks und Berechnung der Flächeninhalte wurden die Flä-

chen der Proben mit denen der bekannten Standards verglichen und die Vitamin C-Konzentration der Proben ausgerechnet.

#### ***4.7.3.3 Bestimmung der Vitamin E-Konzentration im Plasma***

Die Vitamin E-Konzentration im Plasma wurde mittels high performance liquid chromatography (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion gemessen. Nach Präzipitation der Plasmaproteine mit Ethanol wurde das Vitamin E mit Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde unter Stickstoffgas verdampft und das trockene Vitamin E in ein Methanol-Ethanol-Gemisch für die HPLC-Analytik aufgenommen.

##### *HPLC- Analytik*

Pumpe:	Jasco BIP 1, Flussrate: 1ml/ min, Druck: 0,9 x 100 kg/cm <sup>2</sup>
Probengeber:	Spectra System AS 3000, Spectra- Physics Analytical
Probenvolumen:	50 µl
Analysezeit:	10 min.
Säule:	Lichrosorb RP 18, 5 µm, 125 x 4mm, Fa. Grom
Detektor:	Jasco 821 FP Fluoreszenzdetektor (Exzitation 290 nm, Emission 330 nm)

##### *Auswertung*

Die statistischen Auswertungen erfolgte mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Microsoft®, Borwin). Nach Integration der Peaks und Berechnung der Flächeninhalte wurden die Flächen der Proben mit denen der bekannten Standards verglichen und die Vitamin C-Konzentration der Proben ausgerechnet.

#### ***4.7.3.4 Bestimmung von GSH und GSSG im Vollblut***

Zur Analyse von Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) im Vollblut wurde die nach Svardal et al. (1989) beschriebenen Methode modifiziert nach Stohrer et al. (2004) angewandt.

Dieser Test erfasst reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) im Vollblut. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird in Anwesenheit von Natriumborhydrid zu GSH umgewandelt und nach vorangegangener Derivatisierung mit Monobrombimane, mittels reversed-phase-HPLC und Fluoreszenz-Detektion, quantitativ bestimmt. Die Zugabe von Dithioerythritol verhindert eine verschlechterte Wiederfindung bei niedrigen GSH- Konzentrationen.

Bestimmt wurde erst das Gesamt-Glutathion (GSH + GSSG), nachdem das oxidierte GSH (GSSG) zu GSH umgewandelt wurde (s. o.). Dabei wurde aus einem Mol GSSG durch Spaltung der Disulfidbrücken zwei Mol GSH. In der zweiten Analyse wurde die Konzentration des freien GSH ermittelt. Rechnerisch wurde dann die Differenz zwischen Gesamt-GSH und freien GSH bestimmt. Das Ergebnis ist die im Vollblut bestimmbare Menge an GSSG.

#### ***Probengewinnung***

Dem gewonnenen Vollblut wurde direkt nach der Blutabnahme 5 %ige SSA in einem Verhältnis 1 + 3 hinzugefügt. Dann wurde der Inhalt der Monovette durch leichtes Schütteln vermischt (siehe Material und Methoden 3.5.1). Anschließend wurden die Proben bei – 80°C eingefroren.

#### ***HPLC- Bedingungen***

Gradientenprogrammer: Jasco GP A50

Pumpen: 2 Jasco BIP 1 Pumpen, gesteuert über Gradientenprogrammer

Probengeber: Spectra Physics, Spectra Systems AS 3000

Probenvolumen: 10 µl

Analysezeit: 42 min

HPLC- Säule: Chrom Sil 120. ODS 4 HE, 3  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm

Fluoreszenzdetektor: Jasco 821 FP, Excitation 400 nm, Emission 475 nm

### *Auswertung*

Die Auswertungen erfolgte mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Microsoft®, Borwin). Die GSH-Peaks von Standard und Proben wurden integriert und die Flächen berechnet.

## **4.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erzielten Werte wurden mit dem PC-Programm SAS (Statistical Analysis System) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) mit den zugehörigen Standardabweichungen ( $\pm\text{SD}$ ) dargestellt.

Die jeweiligen Daten wurden zunächst mit Hilfe der Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede geprüft. Der Zwei-Gruppen-Vergleich wurde im Falle eines statistisch signifikanten Wertes ( $p < 0,05$ ) mit dem nicht parametrischen zweiseitigen Wilcoxon-Test durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind mit Sternsymbolen (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;

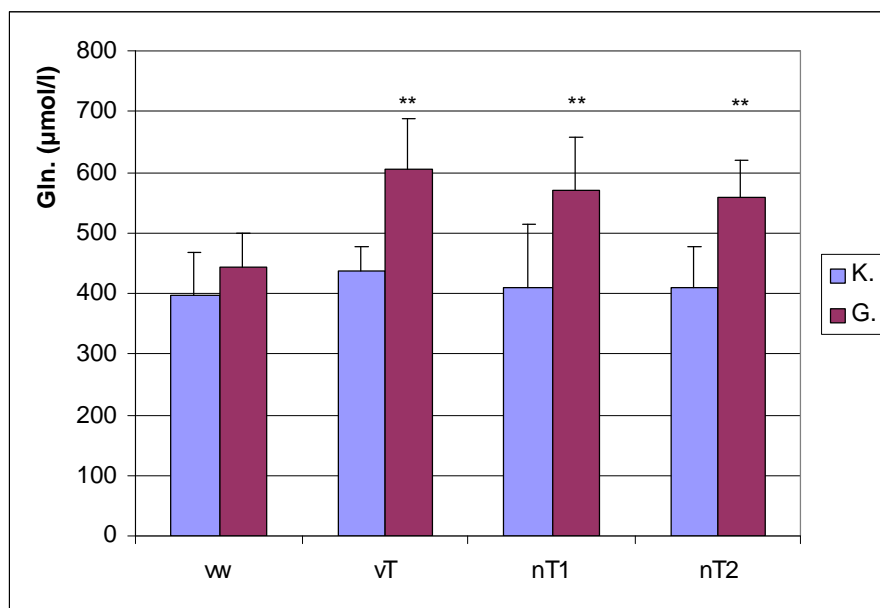
\*\*\* =  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Glutaminkonzentration im Serum

Zunächst sollte geklärt werden, ob es nach einer oralen Supplementierung mit Glutamin zu einer messbaren Erhöhung der Glutamin-Konzentration im Blut kommt und dadurch zur Glutathion-Synthese vermehrt zur Verfügung steht.

Dazu wurden die Glutamin-Konzentrationen im Serum bestimmt. In der Kontrollgruppe waren die mittleren Glutamin-Konzentrationen (K) während des gesamten Beobachtungszeitraums unverändert (K vw-K nT2:  $400 \pm 73 \mu\text{mol/l}$ , MW  $\pm$  SD, n = 32). Infolge der Supplementierung lagen die Glutamin-Konzentrationen in der behandelten Gruppe um ca. 50% und statistisch signifikant höher (G vT  $600 \pm 82 \mu\text{mol/l}$ ; G nT1:  $570 \pm 86 \mu\text{mol/l}$ ; G nT2:  $560 \pm 63 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD, n= 7) als in der Kontrollgruppe.



**Abb.7: Mittlere ( $\pm$  SD) Glutaminkonzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) im Serum der beiden Untersuchungsgruppen (\*\* =  $p < 0,01$ ; Vergleich der Gruppe G mit K zu den jeweiligen Zeitpunkten).**

## 5.2 Blutbild

Wie Tabelle 2 darstellt, wiesen die aus dem roten Blutbild erfassten Parameter während der gesamten Messperiode keine deutlichen Veränderungen auf. Dies gilt sowohl für die glutaminsupplementierte- als auch für die Kontrollgruppe.

**Tab. 2: Mittlere ( $\pm$  SD) Werte des roten Blutbildes der beiden Untersuchungsgruppen**

	<b>K - Gruppe</b>		<b>G – Gruppe</b>	
	<b>vT</b>	<b>nT</b>	<b>vT</b>	<b>nT</b>
Ery [T/ l]	7,71 $\pm$ 0,99	8,04 $\pm$ 0,79	7,47 $\pm$ 0,89	7,85 $\pm$ 0,53
Hb [mmol/ l]	0,87 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,09
HKT [l/ l]	0,33 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,01
MCV [fl]	44,20 $\pm$ 3,50	44,10 $\pm$ 3,40	45,60 $\pm$ 2,50	45,80 $\pm$ 2,60
MCH [fmol]	1,13 $\pm$ 0,12	1,17 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,14	1,10 $\pm$ 0,14
MCHC [mmol/ l]	25,70 $\pm$ 2,70	26,50 $\pm$ 0,80	24,40 $\pm$ 3,10	24,10 $\pm$ 2,90

Bei der Auswertung des Differentialblutbildes (Tab. 3) fiel ein höherer mittlerer Prozentsatz der neutrophilen Granulozyten nach dem Training auf.

Diese Veränderung konnte in beiden Gruppen beobachtet werden. Dabei stieg der Wert in der Kontrollgruppe von 62 % auf 69 % (MW  $\pm$  SD, n= 8), und in der glutaminsupplementierten Gruppe von 63 % auf 67 % (MW  $\pm$  SD, n= 7).

Dieser erwartungsgemäße Anstieg wurde hervorgerufen durch die körperliche Belastung des Grasbahntrainings und ist in der Literatur dokumentiert (Dietz und Huskamp, 1999; Hodgson und Rose, 1994).

Die weiteren Parameter des Differentialblutbildes zeigten keine erkennbaren Veränderungen.

**Tabelle 3: Mittlere ( $\pm$  SD) Werte des Differentialblutbildes der beiden Untersuchungsgruppen.**

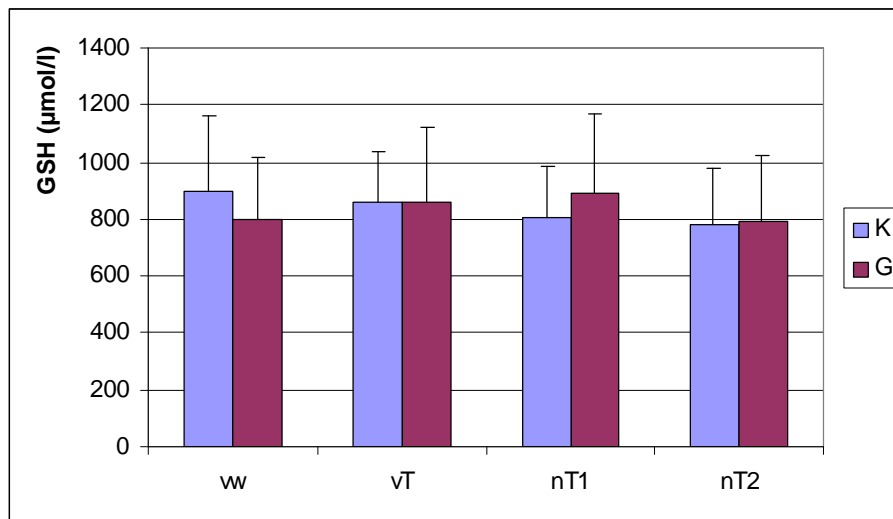
	<b>K - Gruppe</b>		<b>G – Gruppe</b>	
	<b>vT</b>	<b>nT</b>	<b>vT</b>	<b>nT</b>
Mono %	3,89 $\pm$ 1,76	2,49 $\pm$ 1,70	4,08 $\pm$ 2,21	2,95 $\pm$ 1,46
Lym %	32,83 $\pm$ 5,68	27,18 $\pm$ 5,18	31,16 $\pm$ 7,15	28,44 $\pm$ 7,93
Neu %	61,75 $\pm$ 6,64	68,99 $\pm$ 5,63	63,44 $\pm$ 8,14	67,29 $\pm$ 7,51
Leu 10e3/ $\mu$ l	7,81 $\pm$ 0,97	7,87 $\pm$ 0,71	7,67 $\pm$ 1,26	6,96 $\pm$ 1,06
Eos %	1,40 $\pm$ 0,82	1,23 $\pm$ 0,71	1,18 $\pm$ 0,63	1,20 $\pm$ 0,43
Baso %	0,15 $\pm$ 0,13	0,12 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,14	0,12 $\pm$ 0,08

### 5.3 Antioxidativer Status

#### 5.3.1 Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) im Vollblut

Die GSH-Konzentrationen im Vollblut (Abb.8) lagen bei 800  $\mu\text{mol/l}$ . Es gab weder zwischen den Entnahmezeiten noch zwischen den Behandlungsgruppen statistisch signifikante Unterschiede.

In der Kontrollgruppe (K) sind die Mittelwerte der Blut-GSH-Konzentrationen vor dem Training etwas höher (Kvw:  $898 \pm 265 \mu\text{mol/l}$ ; KvT:  $856 \pm 181 \mu\text{mol/l}$ ) als nach dem Training (KnT1:  $803 \pm 182 \mu\text{mol/l}$ ; KnT2:  $776 \pm 198 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD, n = 6). In der glutaminsupplementierten Gruppe (G) war die mittlere GSH-Konzentration direkt nach dem Training etwas höher als in der Kontrollgruppe (GnT1:  $891 \pm 277 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD, n = 6).



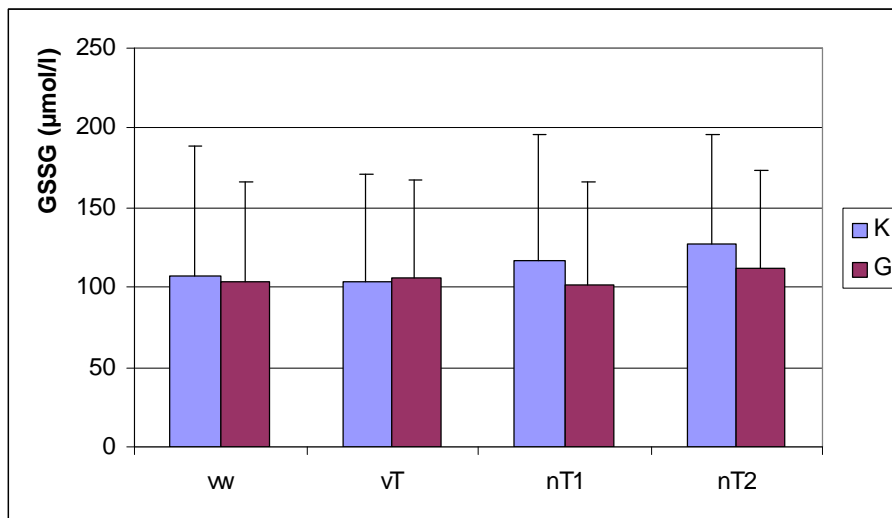
**Abb. 8: Mittlere ( $\pm$  SD) Glutathion-Konzentrationen (GSH) im Vollblut ( $\mu\text{mol/l}$ ) in den beiden Untersuchungsgruppen.**



Die mittleren Glutathiondisulfid-Konzentrationen (Abb. 9) lagen im Bereich von 100 - 130  $\mu\text{mol/l}$  und waren damit erwartungsgemäß deutlich niedriger als die GSH-Konzentrationen. Auch hier traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten sowie den Behandlungsgruppen auf.

Die analysierten Werte zu den Zeitpunkten vw und vT waren in beiden Gruppen annähernd gleich. Nach dem Grasbahntraining waren die mittleren GSSG-Konzentrationen in der Kontrollgruppe höher als vor dem Training (K vw:  $107 \pm 81 \mu\text{mol/l}$ ; K vT:  $104 \pm 67 \mu\text{mol/l}$ ; K nT1:  $116 \pm 79 \mu\text{mol/l}$ ; K nT2:  $127 \pm 69 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD, n = 6).

In der glutaminsupplementierten Gruppe blieben die mittleren GSSG-Konzentrationen nach dem Training niedriger (G nT1:  $101 \pm 65 \mu\text{mol/l}$ ; G nT2:  $112 \pm 61 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD; n = 6) als in der Kontrollgruppe.



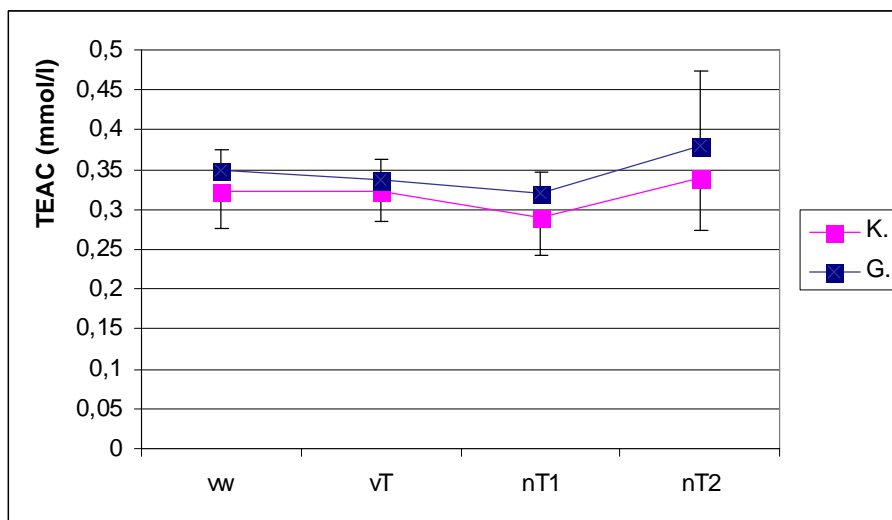
**Abb. 9: Mittlere ( $\pm$ SD) Glutathiondisulfid (GSSG) Konzentration im Vollblut ( $\mu\text{mol/l}$ ) der beiden Untersuchungsgruppen.**

### 5.3.2 Antioxidative Kapazität (TEAC)

In der Abb.10 ist die mittlere Serum TEAC ( $\pm$  SD) der beiden Untersuchungsgruppen dargestellt. Die TEAC lag in beiden Gruppen während der gesamten Messdauer bei ca. 0,35mmol/l. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten sowie Behandlungsgruppen traten nicht auf.

Die Werte beider Gruppen zu den Zeitpunkten vw und vT wiesen keine Veränderungen auf. Direkt im Anschluss an das Grasbahntraining wurde eine niedrigere mittlere TEAC in der Kontrollgruppe gemessen (K vT:  $0,323 \pm 0,038$  mmol/l; K nT1:  $0,290 \pm 0,048$  mmol/l; MW  $\pm$  SD, n = 8) als vor dem Training.

Die Werte der glutaminsupplementierten Gruppe waren von vw-nT1 annähernd konstant. 20 Stunden nach Ablauf des Grasbahntrainings waren sowohl in der Kontrollgruppe (K nT2:  $0,400 \pm 0,066$  mmol/l ) als auch in der glutaminsupplementierten Gruppe (G nT1:  $0,321 \pm 0,026$  mmol/l; G nT2:  $0,400 \pm 0,095$  mmol/l; MW  $\pm$  SD, n= 7) tendenziell höhere Werte der TEAC zu messen. Auffällig ist, dass die Mittelwerte der glutaminsupplementierten Gruppe während des gesamten Beobachtungszeitraums höher waren als die der Kontrollgruppe.



**Abb. 10: Mittlere TEAC Werte ( $\pm$  SD) im Serum (mmol/l) der beiden Untersuchungsgruppen**

### 5.3.3 Antioxidativ wirksame Vitamine (Vitamin C und Vitamin E)

Die Plasma Vitamin C-Konzentrationen bewegten sich zwischen 11 und 13  $\mu\text{mol/l}$ . Signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten und Untersuchungsgruppen traten nicht auf.

Die mittlere Konzentration des hydrophilen Antioxidans Vitamin C war in der Kontrollgruppe (K) 20 Stunden nach dem Grasbahntraining niedriger als direkt nach dem Training (K nT1:  $12,95 \pm 5,28 \mu\text{mol/l}$ ; K nT2:  $11,23 \pm 5,53 \mu\text{mol/l}$ ,  $n = 8$ ) und im Vergleich zu der glutaminsupplementierten Gruppe (G nT2:  $13,46 \pm 2,99 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD,  $n = 7$ ).

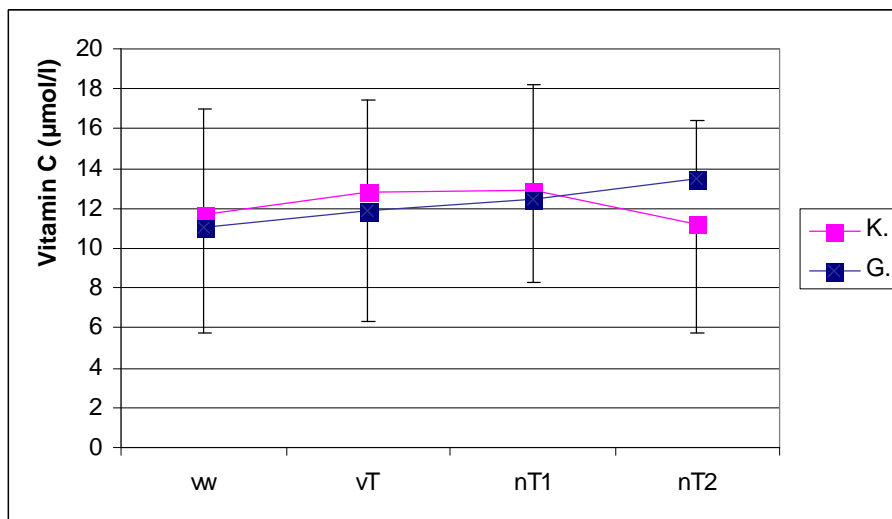
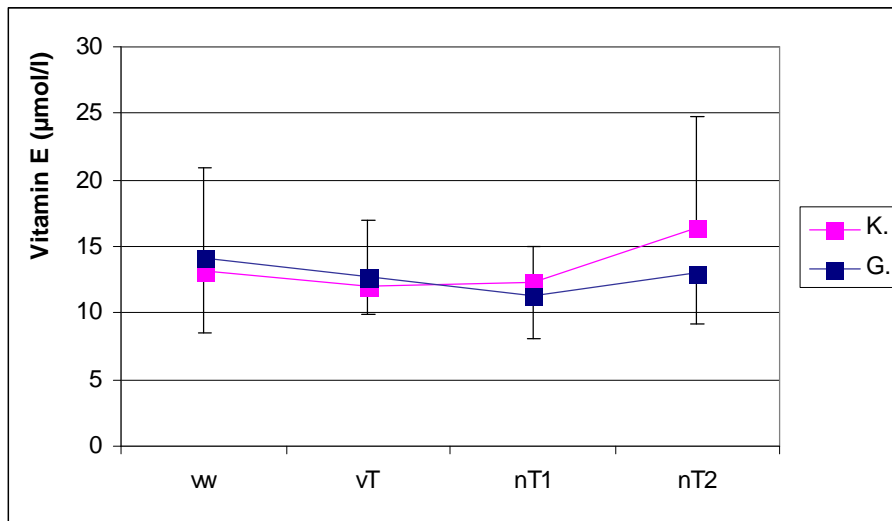


Abb. 11: Mittlere ( $\pm$  SD) Plasma Vitamin C Konzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) der beiden Untersuchungsgruppen.



**Abb. 12: Mittlere ( $\pm$  SD) Plasma Vitamin E Konzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) der beiden Untersuchungsgruppen.**

Die Plasma Vitamin E-Konzentration zeigte einen relativ konstanten Verlauf in beiden Untersuchungsgruppen. Die mittleren ( $\pm$  SD) Konzentrationen zu den Zeitpunkten vw und vT der beiden Untersuchungsgruppen ergaben eine nahezu gleiche Konzentration (G vw:  $14,19 \pm 6,78 \mu\text{mol/l}$ ; G vT:  $12,74 \pm 4,24 \mu\text{mol/l}$ , MW  $\pm$  SD, n = 7 und K vw:  $13,11 \pm 4,56 \mu\text{mol/l}$ ; K vT:  $11,98 \pm 2,10 \mu\text{mol/l}$ ; MW  $\pm$  SD, n = 8). Nur zum Zeitpunkt nT2 konnte in der Kontrollgruppe ein höherer Mittelwert von  $16,40 \pm 8,33 \mu\text{mol/l}$  im Vergleich zur glutaminsupplementierten Gruppe gemessen werden.

## 5.4 Parameter zur Beurteilung der Belastung

### 5.4.1 Laktatkonzentration

Abbildung 13 stellt die mittleren Laktat-Konzentrationen der beiden Untersuchungsgruppen dar. Zum Zeitpunkt vw waren die Laktat-Konzentrationen in beiden Gruppen ähnlich. Das Grasbahntraining verursachte sowohl in der glutaminsupplementierten Gruppe als auch in der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der Laktat-Konzentration, verglichen mit ihren Vorwerten. Die Konzentrationen in der glutaminsupplementierten Gruppe stiegen von G vw  $0,68 \pm 0,38$  mmol/l auf G nT1  $1,28 \pm 0,85$  mmol/l (MW  $\pm$  SD, n = 7) direkt nach dem Grasbahntraining. In der Kontrollgruppe stieg die Konzentration von K vw  $0,63 \pm 0,30$  mmol/l auf  $1,59 \pm 1,26$  mmol/l zum Zeitpunkt nT1 (MW  $\pm$  SD, n = 8). Beide Laktat-Spiegel erreichten 20 Stunden nach dem Grasbahntraining wieder den ursprünglichen Wert.

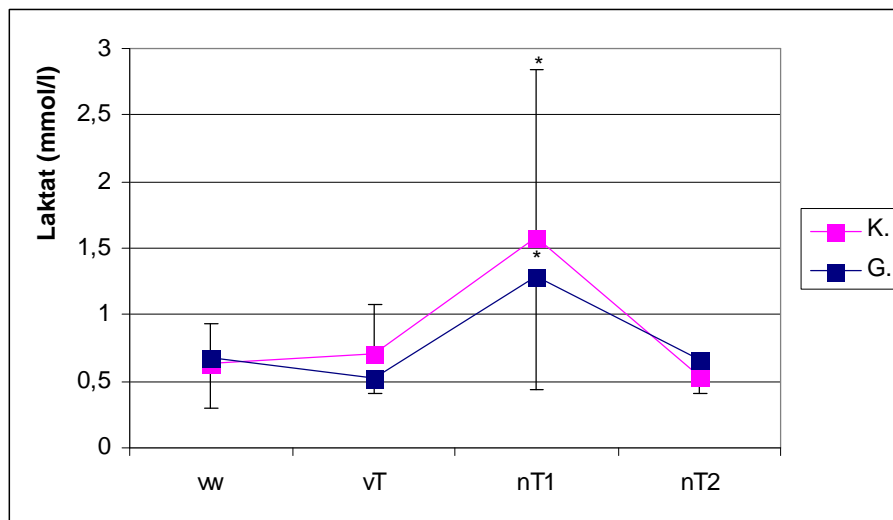
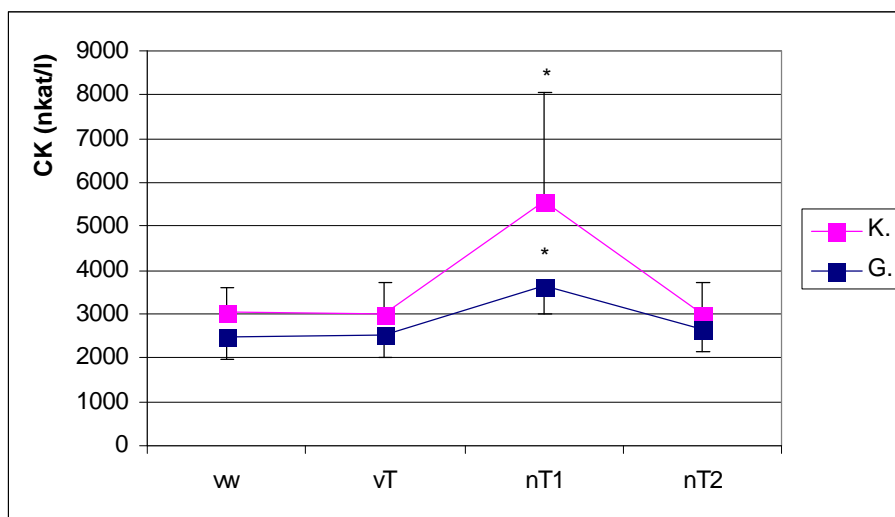


Abb. 13: Mittlere ( $\pm$  SD) Laktat Konzentrationen im Plasma (mmol/l) der beiden Untersuchungsgruppen (\* =  $p < 0,05$ ; geprüft jeweils gegen vw derselben Gruppe).

### 5.4.2 Kreatinkinase (CK)

Das Enzym Kreatinkinase (CK) wurde im Serum der Pferde bestimmt. Die Aktivitäten der CK waren vor dem Training (vw und vT) in beiden Untersuchungsgruppen konstant.

Nach dem Grasbahntraining (nT1) kam es zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung im Serum sowohl in der Kontrollgruppe (K vw:  $3048 \pm 538$  nkat/l; K nT1:  $5559 \pm 2484$  nkat/l;  $MW \pm SD$ , n= 8) als auch in der glutaminsupplementierten Gruppe (G vw:  $2486 \pm 517$  nkat/l; G nT1:  $3622 \pm 627$  nkat/l;  $MW \pm SD$ , n= 7). Dieser Anstieg betrug 87% in der Kontrollgruppe und war wesentlich stärker ausgeprägt als in der glutaminbehandelten Gruppe (44%;  $p < 0,05$ ). In beiden Untersuchungsgruppen wurden zum Zeitpunkt nT2 wieder die ursprüngliche Aktivität wie bei den Vorwerten gemessen.



**Abb. 14:** Mittlere Enzymaktivitäten ( $\pm SD$ ) der Kreatinkinase (CK) im Serum (nkat/ l) der beiden Untersuchungsgruppen ( \* =  $p < 0,05$ ; gegen vw derselben Gruppe; sowie zwischen K nT1 und G nT1).

### 5.4.3 Weitere ausgewählte klinisch-chemische Parameter

Tabelle 4 stellt die Werte der weiteren klinisch-chemischen Parameter dar. Nach dem Grasbahntraining wurden höhere mittlere Enzymaktivitäten von GLDH und LDH im Blutserum gemessen. Auch die mittleren Konzentrationen von Bilirubin und Kreatinin waren nach dem Training höher (nicht signifikant), während das Laktat erwartungsgemäß deutlich anstieg.

Die übrigen gemessenen Parameter (Harnstoff, Gesamteiweiß, AST) blieben durch die Glutaminsupplementierung und das Grasbahntraining unbeeinflusst.

**Tabelle 4: Mittlere ( $\pm$  SD) Werte der klinisch-chemischen Parameter in der Kontrollgruppe.**

	<b>K - Gruppe</b>			
	<b>vw</b>	<b>vT</b>	<b>nT1</b>	<b>nT2</b>
T- Bil. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$36,76 \pm 4,99$	$36,15 \pm 7,44$	$39,50 \pm 9,82$	$39,22 \pm 6,11$
GLDH [ $\mu\text{mol/l/ sec}$ ]	$0,04 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,09$	$0,13 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,02$
LDH [ $\mu\text{mol/l/ sec}$ ]	$4,41 \pm 1,11$	$4,38 \pm 1,04$	$4,66 \pm 0,71$	$3,96 \pm 0,81$
EIW [g/l]	$62,58 \pm 4,02$	$62,60 \pm 3,76$	$62,49 \pm 4,33$	$61,47 \pm 4,00$
HST [mmol/l]	$4,97 \pm 1,30$	$5,00 \pm 0,71$	$5,62 \pm 0,94$	$5,48 \pm 0,94$
CREAT [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$110,75 \pm 15,56$	$113,88 \pm 16,52$	$131,50 \pm 22,60$	$113,5 \pm 18,72$

**Tabelle 5: Mittlere ( $\pm$  SD) Werte der klinisch-chemischen Parameter in der Glutamingruppe**

	<b>G - Gruppe</b>			
	<b>vw</b>	<b>vT</b>	<b>nT1</b>	<b>nT2</b>
T- Bil. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$36,24 \pm 4,91$	$35,19 \pm 4,03$	$33,69 \pm 6,79$	$33,01 \pm 6,68$
GLDH [ $\mu\text{mol/l/ sec}$ ]	$0,05 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,12$
LDH [ $\mu\text{mol/l/ sec}$ ]	$4,06 \pm 0,46$	$4,22 \pm 0,29$	$5,16 \pm 0,67$	$4,82 \pm 0,57$
EIW [g/l]	$62,71 \pm 3,97$	$62,53 \pm 5,00$	$63,10 \pm 5,24$	$63,07 \pm 5,02$
HST [mmol/l]	$4,88 \pm 1,25$	$5,06 \pm 1,08$	$5,24 \pm 0,89$	$5,16 \pm 0,83$
CREAT [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$121,57 \pm 11,31$	$121,42 \pm 12,55$	$135,57 \pm 14,53$	$118,28 \pm 13,62$

## **6 Diskussion**

---

### **6.1 Glutamin**

#### **6.1.1 Dosierung von Glutamin**

Zur Überprüfung der Wirkung von Glutamin auf das GSH-System sollte durch orale Supplementierung die Menge des zur Synthese von GSH verfügbaren Glutamins erhöht werden.

Als Höhe der täglich verabreichten Glutaminmenge wurden 20 g/100 kg Körpergewicht/Tag festgelegt. Diese Dosis wurde aus den in der Literatur verfügbaren Daten für Menschen abgeleitet. Fürst et al. (1997) setzten eine Dosis von 0,3 g/kg/Tag bei menschlichen Frühgeborenen ein. In einer anderen Studie wurde postoperativ an Patienten nach einem gastro-intestinalen Eingriff eine Dosis von 0,3 g/kg/Tag Glutamin entweder enteral oder parenteral verabreicht (Fish et al., 1997). Dies gilt auch für weitere Untersuchungen an Krebskranken und Brandopfern. Es wurde auch hier eine tägliche Menge von 0,3 - 0,45 g/kg/Tag über jeweils fünf Tage verabreicht (Vinnars et al., 1990; O'Flaherty und Bouchier-Hayes, 1999). Literatur über die Dosierung von Glutamin bei Pferden lag nicht vor. Die eingesetzte Konzentration und die Dauer der Anwendung wurde durch Anlehnung an die oben genannten Studien ermittelt. Berücksichtigt wurde dabei, dass der Grundumsatz je Einheit Körpermasse beim Pferd niedriger ist als beim Menschen (Kirchgeßner, 1997). Demzufolge wurde eine Dosierung von 20g/100kg/Tag und eine Supplementierung über fünf Tage festgelegt.

#### **6.1.2 Applikationsart und Verträglichkeit von Glutamin**

Die Aminosäure Glutamin wurde den Pferden oral verabreicht, indem es dem täglichen Kraftfutter untergemischt wurde. Mehrere Studien berichten über den Vorzug von parenteral appliziertem Glutamin. Enteral gegebenes Glutamin wurde in diesen Studien zu 50 - 70% vom Gastrointestinaltrakt und der Leber verstoffwechselt. Eine Erhöhung der Plasma-Glutaminkonzentration konnte nicht nachgewiesen werden (Lacey und Wilmore, 1990; Fish et al., 1997).



Im Serum der glutaminsupplementierten Gruppe unserer Studie wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der Konzentration von  $400 \pm 54 \mu\text{mol/l}$  zum Vorwert auf  $600 \pm 80 \mu\text{mol/l}$  nach dem vierten Tag (vT) der Supplementierung gemessen. Eine erhöhte Bereitstellung von Glutamin für die GSH-Synthese war demzufolge gegeben. Dies entspricht den Ergebnissen von Houdijk et al. (1998), die eine Vergleichsstudie an 60 Trauma-Patienten durchführten. Diesen wurde entweder enteral oder parenteral Glutamin zugeführt. In beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Glutaminkonzentration im Plasma.

Über den Einsatz und die Verträglichkeit von Glutamin bei Pferden ist wenig bekannt.

Um eventuelle Nebenwirkungen bei den Pferden durch die Glutamingabe auszuschließen, wurden vor Beginn der Studie zwei Vorversuche durchgeführt. Hierfür standen zwei Pferde des Institutes für Tierverhalten der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung. Beide Pferde erhielten Glutamin fünf Tage über das Futter supplementiert. Die Dosierung entsprach der später eingesetzten Menge von  $0,2 \text{ g/kg/Tag}$ . Es wurden täglich Blutbilder erstellt und zusätzlich die Elektrolyte im Plasma bestimmt, um beginnende gastrointestinale Störungen zu erkennen (siehe Tab. 7). Die Pferde wiesen während des Versuchs weder Verhaltensänderungen noch Anzeichen für eine Erkrankung auf. Die Blutbilder und Elektrolyte blieben unverändert. Auch Studien an Menschen zeigten diese Ergebnisse. Glutamin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von  $0,1 - 0,57 \text{ g/kg/Tag}$  sowohl in parenteraler Form als auch enteral appliziert. Die Untersuchungen wurden an gesunden und kranken Menschen über einen Zeitraum von vier Stunden bis zu 15 Tagen durchgeführt. Es zeigten sich weder Anzeichen von Nebenwirkungen noch traten im Blut vermehrt toxische Metabolite (Ammoniak, Glutamat) auf (Ziegler et al., 1990). Wie bei den Vorversuchen kam es auch während des Versuchablaufs bei den Rennpferden zu keinen Nebenwirkungen. Das Verhalten der Galopprennpferde und ihre Blutbilder blieben unverändert. Auch die weiteren Parameter (Aktivitäten der Enzyme: CK, LDH, AST, GLDH; klinisch-chemische Parameter: Laktat, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamteiweiß), die zur Beurteilung von potentiell auftretenden Organschäden gemessen wurden, blieben durch die Glutamingabe unbeeinflusst.

**Tabelle 6: Elektrolyt-Bestimmung im Serum von zwei Pferden während der Vorversuche.**

	<b>Tage</b>	<b>Na [mmol/ l]</b>	<b>K [mmol/ l]</b>	<b>Ca [mmol/ l]</b>
Pferd 1	0	140,3	4,52	2,88
	1	138,7	3,96	2,87
	3	137,5	4,27	2,75
	5	136,7	4,19	2,70
Pferd 2	0	138,7	3,97	2,91
	1	141,2	3,54	2,85
	3	138,0	3,60	2,92
	5	138,6	3,57	2,83

### **6.1.3 Glutaminkonzentration im Blut in Abhängigkeit von der Supplementierung und dem Grasbahntraining**

Die Vorwerte beider Untersuchungsgruppen lagen bei 400  $\mu\text{mol}$  Glutamin/l Blut. Diese Konzentrationen von Glutamin entsprechen den von King und Suleiman (1998) gemessenen Werten. In ihrer Studie wurden mittlere Glutamin-Konzentrationen von  $376 \pm 19 \mu\text{mol/l}$  im Plasma von Galopprennpferden gemessen. In der G-Gruppe war infolge der Glutaminsupplementierung ab dem Zeitpunkt vT ein signifikanter Anstieg der Glutamin-Konzentration im Serum zu messen. Dieser blieb auch an den folgenden Probennahmen (nT1, nT2) bestehen.

Dass es bei Hochleistungssportlern zu einem Abfall des Glutamin-Spiegels durch maximales Training kommen kann, belegen einige Autoren (Newsholme, 1994; Castell et al., 1997). Sie stellten fest, dass Glutamin aus der Skelettmuskulatur, dem größten Glutaminspeicher des Organismus, ausgeschleust wird und für andere Organe mit einer geringeren Glutaminsyntheserate zur Verfügung steht. Die Kapazität zur Resynthese von Glutamin in der Muskulatur ist begrenzt, so dass es in einer extremen Stoffwechsellage zu einem Glutaminmangel kommt. Beide Untersuchungen wurden bei Marathonläufern durchgeführt, allerdings handelte es sich dabei um eine Ausdauersportart.

In unserer Studie betrug die Zeit des Grasbahntrainings, das heißt der maximalen Belastung, ca. 15 Minuten. Es konnte kein Abfall der Glutaminkonzentration gemessen werden. Die Ruhewerte (vw, vT) der Kontrollgruppe unterschieden sich kaum von den gemessenen Werten nach dem Training (nT1, nT2). Die tendenzielle Abnahme der Glutamin-

Konzentration in der supplementierten Gruppe, ist eher auf eine Anpassung des Stoffwechsels zurückzuführen, da sie auch in den Vorversuchen bei nicht trainierten Pferden auftrat.

## **6.2 Einfluss des Glutamins auf den antioxidativen Status**

### **6.2.1 Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) im Vollblut**

Die Glutathion-Analysen vor dem Training (vw) ergaben in der Kontrollgruppe eine mittlere GSH-Konzentration von  $898 \pm 265 \mu\text{mol/l}$  und eine GSSG-Konzentration von  $108 \pm 81 \mu\text{mol/l}$ . Diese entsprechen den von Art et al. (1999) gemessenen Konzentrationen von GSH und GSSG bei gesunden Pferden.

Die Mittelwerte des GSH in der Kontrollgruppe waren nach dem Training niedriger, die GSSG-Mittelwerte waren dagegen etwas höher als vor dem Training. Obwohl diese Unterschiede statistisch nicht signifikant sind, stützen diese Veränderungen die anfangs aufgestellte Hypothese und stimmen mit publizierten Untersuchungen bei Menschen und Tieren nach einer akuten physischen Belastung überein (Sen et al., 1994; Gul et al., 2000), die in mehreren Geweben, einschließlich der Erythrozyten, gleichartige Veränderungen gefunden haben. Physische Belastung ist verbunden mit maximaler Muskelarbeit, die eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in den Mitochondrien verursacht. Eine vermehrte Entstehung von Sauerstoffradikalen ist die Folge. GSH wird dann in den Zellen oxidiert und schützt andere Zellstrukturen vor der Oxidation (Ohlenschläger, 2000).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, waren höhere mittlere GSSG-Konzentrationen in der glutaminsupplementierten Gruppe nach dem Training nicht zu beobachten. Auch dieser fehlende Anstieg wäre durch den Einfluss von Glutamin auf die GSH-Synthese zu erklären.

In der Literatur liegen vergleichbare Messungen im Vollblut nicht vor. Denno et al. (1996) konnten einen signifikanten Plasma-Anstieg von GSH nach einer Glutaminsupplementierung bei Ratten messen. Auch ein Anstieg von GSH in Leber und Darm konnte nach Supplementierung mit Glutamin nachgewiesen werden (Hong et al., 1992; Harward et al., 1994). Es ist denkbar, dass die GSH-Synthese in den Erythrozyten weniger stark zu beeinflussen ist als in anderen Geweben. Daher könnte auch in unserer Studie ein deutlicher

Anstieg in den Muskelzellen erfolgt sein, der dann zu der ausgeprägten protektiven Wirkung geführt hat, die hier als eindeutig verminderter Anstieg der Aktivität der Kreatinkinase sichtbar war.

### **6.2.2 Antioxidative Kapazität (TEAC), Vitamin C und Vitamin E**

Die Ausgangswerte der TEAC vor der Glutamingabe und vor der Belastung entsprechen den von Stohrer et al. (2001) gemessenen Werten bei Fohlen. Die Werte der TEAC scheinen zwischen den Arten zu variieren. In einer anderen Studie an Schlittenhunden konnte eine TEAC von 0,8 mmol/l als Ruhewert gemessen werden (Stohrer et al., 2002).

Der Verlauf der TEAC in beiden Untersuchungsgruppen blieb auf gleichem Niveau. Eine niedrigere mittlere TEAC kurz nach dem Training (nT1), war in dieser Studie nur angedeutet und nach 20 Stunden nicht mehr zu erkennen.

Ein ausgeprägter Abfall der TEAC wurde dagegen bei Schlittenhunden nach einem Rennen gemessen. Die Abnahme der TEAC kurz nach der physischen Belastung lässt auf einen vermehrten Verbrauch von Antioxidantien durch die Bildung von Sauerstoffradikalen schließen (Stohrer et al. 2002).

Obwohl die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind fällt auf, dass die mittleren TEAC Werte der glutaminsupplementierten Gruppe während der gesamten Beobachtungszeit höher waren als in der Kontrollgruppe. Eine Erklärung hierfür ist die mögliche Erhöhung der GSH-Synthese durch vermehrte Bereitstellung von Glutamat aus seiner Vorstufe Glutamin. Dies würde einen Anstieg der im Organismus verfügbaren Antioxidantien bewirken und zu einer Erhöhung der TEAC beitragen..

Die gemessenen Vorwerte der Vitamin C-Konzentrationen stimmen mit den Werten anderer Galopprennpferde aus einer Studie von White et al. (2001) überein.

Vitamin C ist ein stark wirksames, hydrophiles Antioxidans (Rokitzky et al., 1994). In Anwesenheit von freien Radikalen wirkt es als Elektronendonator und wird selbst oxidiert.

Das Grasbahntraining verursachte in beiden Gruppen keine Veränderungen der Vitamin C-Konzentration. Andere Studien berichten von einem gemessenen Anstieg des Vitamin C-Spiegels direkt nach einer physischen Belastung durch eine stressbedingte Antwort der

Nebennierenrinde und als Folge eine vermehrte Sekretion von Vitamin C (Maxwell et al., 1993). Anders sind dagegen die Ergebnisse von Gleeson et al. (1987), die einen Abfall des Vitamin C-Spiegels 24 Stunden nach physischer Belastung bei Menschen feststellen konnten. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei einer Studie an Schlittenhunden (Stohrer et al., 2002) und konnte auch bei Pferden belegt werden (Snow, 1990).

Obwohl Pferde über die Enzyme zur Biosynthese von Vitamin C verfügen, wurde auch bei ihnen ein Abfall der Plasma Vitamin C-Konzentration infolge von extremen Stoffwechselsituationen wie Krankheit und physische Anstrengung gemessen. Diese Resultate entsprechen nicht den Ergebnissen unserer Studie.

Höhere mittlere Vitamin C-Konzentrationen in der glutaminsupplementierten Gruppe 20 Stunden nach dem Training (nT2) unterstützen die aufgestellte Hypothese der Glutaminwirkung auf den antioxidativen Status.

Die Vitamin E-Konzentrationen entsprechen den von McMeniman und Hintz (1992) gemessenen Werten bei Ponys. Deutlich höhere Werte wurden bei Menschen gemessen (Maxwell et al., 1993). Hier zeigten Ruhewerte eine Vitamin E-Konzentration von 23  $\mu\text{mol/l}$ .

Vitamin E schützt als lipophiles Antioxidans die Zellmembran und subzelluläre Membranen vor Lipidperoxidation. Dabei reagiert es innerhalb der Membran mit Lipidperoxyldikalen und reduziert diese. Bei dieser Reaktion wird Vitamin E selbst radikalisch und kann durch Vitamin C oder GSH wieder regeneriert werden (McMeniman und Hintz, 1992).

Die Konzentrationen des lipophilen Antioxidans Vitamin E waren annähernd gleich in beiden Gruppen. Der konstante Verlauf der Plasma Vitamin E-Konzentration in beiden Gruppen entspricht den von Maxwell et al., (1993) gemessenen Ergebnissen. Physische Anstrengung beim Menschen verursachte in seiner Studie keine Veränderung der Vitamin E-Konzentration. Stohrer et al., (2002) konnten jedoch bei Schlittenhunden infolge einer physischer Belastung einen Verbrauch von Vitamin E feststellen.

Eine Auswirkung der Glutamingabe auf den Vitamin E-Status der Pferde in unserer Studie war nicht zu verzeichnen.

### **6.3 Parameter zur Beurteilung der physischen Belastung**

#### **6.3.1 Laktat als Nachweis der Belastungsintensität**

In beiden Untersuchungsgruppen war ein signifikanter Anstieg der Laktat-Konzentration direkt nach dem Grasbahntraining zu messen. Die Ruhelaktatwerte entsprachen den in der Literatur angegebenen Konzentrationen bei Pferden mit einem Ruhelaktatwert von maximal 0,9 mmol/l (Kraft und Dürr, 1981).

Die Laktat-Konzentration im Blutplasma ist ein Index für den anaeroben Stoffwechsel.

Laktat wird infolge physischer Anstrengung gebildet. Das Maß der Bildung ist jedoch abhängig von Dauer und Intensität der Belastung (Hodgson und Rose, 1994). Erhöhte Blutlaktatspiegel zeigen an, dass auf anaerobem Wege ATP gebildet worden ist. Während einer starken physischen Belastung kommt es in zunehmenden Maße zur Kontraktion von Typ II Muskelfasern (a und b) die sich durch schnelle Kontraktion, eine mittel, bis geringe oxidative Kapazität und eine hohe glykolytische Kapazität auszeichnen (von Grosskopf et al., 1983). Die anearobe Glykolyse wird gesteigert und Laktat vermehrt gebildet. Das gebildete Laktat diffundiert ins Blut und wird abgebaut bzw. zur Leber transportiert und dort zur Gluconeogenese genutzt. Übersteigt die Laktatproduktion die Elimination, kommt es zu einem starken Anstieg von Laktat im Blut. Rose et al. (1980) fanden bei Untersuchungen, die sie bei Vielseitigkeitsprüfungen durchgeführt haben, im Mittel eine Laktatkonzentration von 8,2 mmol/l direkt im Anschluss an die Belastung. Von Krzywanek et al. (1973), wurden direkt nach Galopprennen Laktatwerte von 30 mmol/l gemessen.

Nach Beendigung der Belastung beginnt sofort der Abbau des Laktat. Je höher die Laktatakkumulation ist, desto mehr Zeit vergeht bis die Ruhewerte wieder erreicht sind (Dietz und Huskamp, 1999). Die Probennahmen erfolgten in unserer Studie erst 30 Minuten nach dem Training, da die Pferde erst dann wieder im Stall zur Verfügung standen. Krzywanek (1973) zeigte, dass bei Pferden, die erhöhte Werte von bis zu 25 mmol/l während der Belastung erreichten, nach ca. 40 Minuten wieder Werte von 3 mmol/l erreichten. Die gemessenen Werte unserer Studie geben demnach keine Information über die wirkliche Höhe der Werte während des Trainings. Es wird aber bestätigt, dass eine Belastung stattgefunden hat, da auch 30 Minuten nach dem Training noch erhöhte Werte gemessen wurden.

Nach Literaturangaben ist es möglich, die Laktatelimination durch leichte Muskeltätigkeit in der Erholungsphase zu beeinflussen (Krzywanek, 1988). Bei diesem „Abarbeiten“ wird

erneut die Skelettmuskulatur verstärkt durchblutet und damit das Sauerstoffangebot an die Zellen gesteigert. Laktat wird beschleunigt zur Leber, zum Herzmuskel und zu anderen Muskelgruppen transportiert, wo es metabolisiert wird.

Die Ausgangskonzentration wird auf diese Weise in wesentlich kürzerer Zeit erreicht. Auch in unserer Studie erfolgte im Anschluss an das Grasbahntraining eine erneute Erwärmung der Skelettmuskulatur. Die Pferde wurden noch einmal ca. 10 Minuten im Trab bewegt und anschließend zum Stall geritten. Erhöhte Laktatwerte 30 Minuten nach dem Training mit anschließender „Abarbeitungsphase“ lassen auf eine relativ starke Belastung durch das Grasbahntraining schließen.

### **6.3.2 Kreatinkinase als Nachweis von Belastungsschäden**

Die Aktivität des Enzyms Kreatinkinase (CK) im Blutserum ist ein Parameter zur Beurteilung von Zellschädigung oder Zelluntergang, insbesondere in der Skelettmuskulatur.

Die gemessenen Aktivitäten waren in beiden Untersuchungsgruppen signifikant erhöht infolge des Grasbahntrainings. Der Wert K nT1 ist signifikant höher im Vergleich zu G nT1.

Die Ruhewerte liegen in den von Kraft und Dürr (1999) angegebenen Normalbereichen der CK bei Pferden. Hier werden Maximalwerte bis 3.200 nkat/l festgelegt. Hodgson und Rose (1994) geben einen Referenzbereich von 1.600 bis maximal 5.000 nkat/l an. Die Autoren beziehen sich besonders auf Galopprennpferde.

Das zelluläre Enzym Kreatinkinase kommt normalerweise nur in geringen Mengen extrazellulär, also im Plasma vor. Seine extrazelluläre Konzentration kann sich aber erhöhen, wenn es zu gravierenden Zellschädigungen (Nekrosen) oder auch zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Zellmembran kommt. Eine Erhöhung der CK-Aktivität infolge starker physischer Belastung ist sowohl bei Menschen als auch bei Pferden nachgewiesen (Snow et al., 1983; Sen, 1995). Der Anstieg der CK bei den Tieren unserer Studie lässt auf eine vermehrte Zellschädigung infolge des Grasbahntrainings schließen. Dabei sind die Enzymaktivitäten in der Kontrollgruppe an nT1 signifikant höher als in der glutaminsupplementierten Gruppe.

Eine Erklärung für die niedrigeren Enzymaktivitäten bei den Pferden mit Glutaminsupplementierung könnte eine verminderte Membranschädigung durch freie Radikale sein.

GSH besitzt die Fähigkeit mit fast allen Sauerstoffradikalen zu reagieren und diese zu reduzieren (Sies, 1999). Bei der Lipidreparatur, die ein Netzwerk von Schutzsystemen darstellt, sind neben nicht-enzymatischen Radikalfängern, wie das fettlösliche Tokopherol, vor allem die beiden selenabhängigen Glutathion-Peroxidasen und GSH als Coenzym eingeschaltet (siehe Literaturübersicht; Ohlenschläger, 2000). Wird die Konzentration des GSH intrazellulär erhöht, ist der Schutz der Zelle vor Lipidperoxidation verbessert und entstandene Membranschäden können schneller beseitigt werden. Eine direkte Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von Malondialdehyd (MDA), einem Endprodukt der Lipidperoxidation und dem Anstieg von GSSG und CK im Blut, konnte bei Pferden nach physischer Belastung gemessen werden (Chiaradia et al., 1998). Eine sauerstoffradikalbedingte Belastung des Muskelgewebes wurde auch in anderen Studien nachgewiesen. Stohrer et al. (2002) stellten einen verminderten Anstieg der Kreatinkinase nach physischer Belastung bei Schlittenhunden in einer Vitamin E supplementierten Gruppe fest.

Myopathien, insbesondere das „tying-up“-Syndrom, ist ein weitverbreitetes Problem bei Rennpferden (Ono et al., 1990). Dabei handelt es sich um eine Stoffwechselstörung der Muskulatur, die schnell zu einer Degeneration der Muskelfasern mit Austritt des Myoglobins führen kann (Dietz und Huskamp, 1999). Ein Zusammenhang zwischen einer akuten Myopathie und einer stark erhöhten Lipidperoxidation konnte bei Mäusen im Anschluss an eine starke physische Belastung nachgewiesen werden (Salminen und Vihko, 1983).

Der infolge der Glutaminsupplementierung um 80% verringerte CK Anstieg ist ein deutlicher Hinweis auf eine verringerte Muskelzellschädigung. Dieses Ergebnis könnte von besonderer Relevanz für die Praxis sein.

## **6.4 Kritische Beurteilung**

Die große Schwierigkeit bei Untersuchungen von im Training stehenden Vollblutpferden unter Feldbedingungen liegt darin, möglichst standardisierte Versuchsbedingungen einzuhalten, da im Gegensatz zu Trabrennpferden nicht mit der Uhr in der Hand eine bestimmte Strecke in einer bestimmten Zeit zurückgelegt wird. Die Jockeys lassen nach Anweisung des Trainers die Pferde über die meist gleiche Distanz mehr oder weniger schnell laufen



(Lindner et al., 1992). Die Distanz wurde in unserer Studie genau festgelegt, die gerittene Geschwindigkeit konnte jedoch nicht standardisiert werden.

Die relativ geringe zur Auswertung nutzbare Tierzahl ist durch die hohe Ausfallquote bedingt. Drei Pferde schieden aus gesundheitlichen Gründen, wie Lahmheit und Leistungsschwäche aus. Bei vier weiteren Pferden wurde aufgrund schlechten Fressverhaltens, ein weit verbreitetes Problem bei Galopprennpferden, kein Glutaminanstieg im Serum gemessen und diese deshalb von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die relativ geringen Veränderungen des antioxidativen Systems könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Untersuchungen an gut trainierten Rennpferden durchgeführt wurden. Physisches Training stärkt das antioxidative System. Eine verminderte Oxidation von GSH im Blut konnte bei Ratten nach einer 5-wöchigen Trainingszeit nachgewiesen werden (Kanter et al., 1985). In anderen Studien wurden erhöhte Aktivitäten der GSH-Peroxidase und der GSSG-Reduktase, sowie eine verminderte Konzentration von GSSG in trainierten Muskeln gemessen (Allessio und Goldfarb, 1988).

Dass eine Belastung stattgefunden hat, wurde anhand eines Anstiegs von Laktat im Plasma belegt, der auch 30 Minuten nach der Anstrengung noch zu messen war. Auch ein signifikanter Aktivitätsanstieg der Kreatinkinase belegt eine vermehrte Muskelgewebsschädigung infolge des Grasbahntrainings.

Deutlichere Effekte wären vermutlich nach einer extremen Belastung aufgetreten. Interessant wären Messungen, die Auswirkungen eines Hürdenrennens untersuchen würden. Während eines Rennens befinden sich die Tiere in einer extremen Stoffwechselsituation mit maximaler physischer Belastung. Eine solche Untersuchung war jedoch unter Feldbedingungen nicht möglich, da der Trainer einer Blutentnahme kurz vor den Rennen und einer Veränderung des Futters durch Glutamin während des Renntages nicht zustimmte.

## 7 Zusammenfassung

---

Starke körperliche Belastung verursacht sowohl bei Menschen als auch bei Tieren eine gesteigerten Genese von Sauerstoffradikalen. Eine maximale Trainingsbelastung von Galopprennpferden führt auch bei diesen Tiere zu oxidativem Stress. Durch nutritive Aufnahme von Antioxidantien wird der antioxidative Schutz des Organismus verbessert und dieser oxidative Stress verringert.

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Hypothese zu prüfen, dass durch orale Supplementierung der Aminosäure L-Glutamin die intrazelluläre Konzentration des Antioxidans Glutathion zunimmt und dadurch oxidativer Stress abgemildert wird. Glutamin dient als Substrat für die Glutathion-Synthese, dem wichtigsten intrazellulär wirksamen antioxidativen System und hat zahlreiche andere positive Stoffwechselfunktionen.

Zur Untersuchung der protektiven Wirkung von Glutamin auf den antioxidativen Status wurde geplant, Hürdenrennpferden, die in vollem Training stehen und damit extremer physischer Belastung ausgesetzt sind, diese Aminosäure über das Futter zu supplementieren. Diese Untersuchungen konzentrierten sich auf ein Grasbahntraining über 3000 Meter, bei dem die Pferde mit hoher Geschwindigkeit über Hindernisse geritten wurden. Die Pferde wurden in eine Kontrollgruppe (K) und eine glutaminsupplementierte Gruppe (G, 20g Glutamin /100kg KGW über vier Tage vor und am Tag des Grasbahntrainings) eingeteilt. Der Verlauf der Glutaminkonzentration im Serum wurde erfasst. Ausgewählte Parameter zur Beurteilung des antioxidativen Status (GSH und GSSG, TEAC, Vitamin E, Vitamin C) und für Gewebeschäden, die auf eine Muskel- oder Leberbelastung sowie auf eventuelle Nebenwirkungen hinweisen, wurden bestimmt (Aktivitäten der Enzyme: CK, LDH, AST, GLDH; klinisch-chemische Parameter: Laktat, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamteiweiß und das Blutbild). Allen Versuchstieren (K und G) wurden innerhalb einer Messperiode, vier Blutproben entnommen: Vorwerte (vw) vier Tage vor dem Grasbahntraining, Werte vor der Belastung (vT), direkt im Anschluss an die Belastung (nT1) und 20 Stunden nach der Belastung (nT2).

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Das oral supplementierte Glutamin wurde von den Pferden gut vertragen. Nebenwirkungen waren weder im Verhalten der Tiere noch im Blutbild zu erkennen. In der glutaminsupplementierten Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg der Glutaminkonzentration im Blut gemessen werden. Somit war eine vermehrte Bereitstellung für die GSH-Synthese gegeben (G vw:  $400 \pm 54 \mu\text{mol/l}$ ; G vT:  $600 \pm 80 \mu\text{mol/l}$ ).

Von den zur Beurteilung von potentiell auftretenden Organschäden gemessenen Parametern waren die mittleren Enzymaktivitäten von GLDH und LDH sowie die mittlere Konzentration von Kreatinin nach dem Training höher (nicht signifikant), während das Laktat erwartungsgemäß deutlich anstieg. Die übrigen gemessenen Parameter (Harnstoff, Gesamteiweiß, AST) blieben durch die Glutaminsupplementierung und das Grasbahntraining unbeeinflusst.

Die Parameter zur Beurteilung des antioxidativen Status wiesen in der glutaminsupplementierten Gruppe höhere GSH- (KnT1:  $803 \pm 182 \mu\text{mol/l}$ ; GnT1:  $891 \pm 277 \mu\text{mol/l}$ ) und niedrigere GSSG-Mittelwerte (K nT1:  $116 \pm 79 \mu\text{mol/l}$ ; G nT1:  $101 \pm 65 \text{mmol/l}$ ) auf. Auch die Mittelwerte der TEAC (K nT1:  $0,290 \pm 0,048 \text{mmol/l}$ ; G nT1:  $0,321 \pm 0,026 \text{mmol/l}$ ) und der Vitamin C-Konzentrationen (K nT2:  $11,23 \pm 5,53 \mu\text{mol/l}$ ; G nT2:  $13,46 \pm 2,99 \mu\text{mol/l}$ ) waren höher in der glutaminsupplementierten Gruppe. Diese Unterschiede sind zwar statistisch nicht signifikant, aber die Vielzahl der erwartungsgemäßen Veränderungen der einzelnen Parameter des antioxidativen Status unterstützen die Hypothese der Steigerung der GSH-Synthese infolge der Glutaminsupplementierung.

Von besonderer Relevanz für die Praxis ist wahrscheinlich der signifikant geringere Anstieg der Kreatinkinase (K nT1:  $5559 \pm 2484 \text{ nkat/l}$ ; G nT1:  $3622 \pm 627 \text{ nkat/l}$ ) in der glutaminsupplementierten Gruppe, welcher auf eine Reduzierung von Muskelgewebeschäden hinweist.

Es wäre interessant, die Wirkung von Glutamin bei einer größeren Anzahl von Pferden und unter maximaler Belastung, wie sie zum Beispiel in einer realen Rennsituation gegeben ist, und in der anschließenden Regenerationsphase zu überprüfen, da dann die Glutaminwirkung wahrscheinlich eindeutig nachgewiesen werden kann.

## 8 Summary

---

### **The glutamine supplement and its effects on the antioxidant status of race horses**

Strong physical exertion causes an increased production of oxygen radicals in humans as well as in animals. The maximum training of race horses also causes a strong oxidative stress. The protection of the organism could be improved by the dietary intake of antioxidants and therefore oxidative stress is reduced.

The aim of this study was to prove the hypothesis that through the oral supplement of the aminoacid L-glutamine, the intra-cellular concentration of the antioxidant glutathione (GSH) could be increased and the result is less oxidative stress. Glutamine serves as a substrate for glutathione-synthesis, the most important intra-cellular antioxidative system and has numerous other metabolic functions.

In order to examine the protective effects of glutamine on the antioxidant status, steeple chase horses at peak training levels which are under extreme physical exertion were given a supplement of the aminoacid L-glutamine in their food. The examination was focused on an intensive training programme on the grass track on a 3000-metres distance with horses ridden at high speed and over hurdles.

The horses were divided into a glutamine supplemented group (G, 20 g/100Kg for a duration of four days before and on the actual day of training) and a control group (K).

The process of Glutamine concentration within the serum was defined. The parameters for observation of the antioxidant status (GSH and GSSG, TEAC, Vitamine C, Vitamine E,) and for tissue damage of liver and muscles as well as possible side effects (activities of enzymes: CK, LDH, AST, GLDH; other clinical parameters: lactate, bilirubin, urea, creatinine, total proteins and hemogram) were determined.

Four blood samples were taken from each horse within a certain period i.e.: Pre-samples four days before the next grass track training (vw), samples shortly before (vT) and after (nT1) and finally 20 hours after exercise (nT2).

The following results have been identified:

All glutamine-supplementation was well tolerated without recognizable side effects neither in behaviour nor in hemogram. Through the supplementation of glutamine, significant increase of glutamine in the blood of the G-group was identified and therefore an increased glutamine availability for GSH-synthesis was evident (G vw:  $400 \pm 54 \mu\text{mol/l}$ ; G vT:  $600 \pm 80 \mu\text{mol/l}$ ).

The parameters concerning tissue damage, like the medium activities of GLDH and LDH as well as medium concentrations of creatinine after training were higher (statistically insignificant) while the level of lactate, was as anticipated, increased. The other measured parameters (urea, total proteine, AST) were not effected by glutamine supplementation.

The parameters for the observation of the antioxidative status showed higher GSH (KnT1:  $803 \pm 182 \mu\text{mol/l}$ ; GnT1:  $891 \pm 277 \mu\text{mol/l}$ ) and lower medium GSSG concentrations (K nT1:  $116 \pm 79 \mu\text{mol/l}$ ; G nT1:  $101 \pm 65 \text{mmol/l}$ ) in the glutamine-supplemented group. Also the values of medium TEAC (K nT1:  $0,290 \pm 0,048 \text{ mmol/l}$ ; G nT1:  $0,321 \pm 0,026 \text{ mmol/l}$ ) and medium Vitamine C concentrations (K nT2:  $11,23 \pm 5,53 \mu\text{mol/l}$ ; G nT2:  $13,46 \pm 2,99 \mu\text{mol/l}$ ) were higher in the glutamine group. Even though the differences are not statistically significant, the plurality of the expected changes of the single parameters of the antioxidative status support the hypothesis of the increased GSH synthesis due to glutamine supplementation.

Of practical relevance were the results of creatine kinase (CK, K nT1:  $5559 \pm 2484 \text{ nkat/l}$ ; G nT1:  $3622 \pm 627 \text{ nkat/l}$ ) which showed a significant reduction in the glutamine-supplemented group which could prove a decrease in the muscle tissue damage.

It would be interesting to test the effects of glutamine in a larger number of horses under maximal exertion such as a racing situation followed by regeneration phase because this could prove the actual effects of glutamine.

## 9 Literaturverzeichnis

---

Ahmad, S., White, C. W., Chang, L. Y., Schneider, B. K. und Allen, C. B., 2001

Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity.

Am-Physiol-Lung-Cell-Mol-Physiol., 280: L779 - L91

Alessio, H. und Goldfarb, A. H., 1988

Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training.

J-Appl-Physiol., 64 (4): 1333 - 6

Arrigo, A. P., 1999

Gene expression and thiol redox status.

Free-Radic-Biol-Med., 27: 936 - 44

Art, T., Kischvink, N., Smith, N. und Lekeux, P., 1999

Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstructions.

Equine-Vet-J., 31 (5): 397 - 01

Askanazi, J., Carpentier, Y. A. und Milchelsen, C. B., 1980

Muscle and plasma amino acids following injury: influence of intercurrent infections.

Ann-Surg., 192: 78 - 85

Bannai, S. und Tsukeda, H., 1979

The export of glutathione from human diploid cells in culture.

J-Biol-Chem., 254: 3444 - 50

Barcley, J. K. und Hansel, M., 1991

Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue.

Can-J-Physiol-Pharmacol., 69: 279 - 84

Belcastro, A., Arthur, G., Albisser, T. und Raj, D., 1996

Heart, liver and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise.

J-Appl-Physiol., 80: 1331 – 5

Bergmeyer, H. U., 1974

Methoden der enzymatischen Analyse.

Verlag Chemie Weinheim /Bergstr., 3.Aufl., Bd. 2, 1767 - 9

Boveris, A. und Cadenas, E., 1975

Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration.

FEBS-Lett., 54 (3): 311- 4

Brady, P. S., Ku, P. K. und Uilrey, D. E., 1978

Lack of effect of selenium supplementation on the response of the equine erythrocyte glutathione system and plasma enzymes to exercise.

J-Anim-Sci., 47: 493 - 6

Burk, R. F. und Lawrence, R. A., 1978

Non- selenium- dependent glutathione peroxidase.

In: functions of glutathione in liver and kidney.

(Eds: Sies, H. und Wendel, A.)

Springer, Berlin: 114 - 9

Butler, P. J., Woakes, A. J., Smale, K., Hilledge, C. A., Snow, C. J. und Marlin, D. H., 1993

Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses.

J-Exp-Biol., 179: 159 - 80

Castell, L. M., Poortmans, J. R., Leclercq, R., Brasseur, M., Duchateau, J. und Newsholme, E. A., 1997

Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation.

Eur-Appl-Physiol., 75 : 47 - 53

Chandan, K. S., 1995

Oxidants and antioxidants in exercise.

J-Appl-Physiol., 79 (3): 675 - 86

Chang, W. K., Yang, K. D., Chuang, H., Jan, J. T. und Shaio, M. F., 2002

Glutamine protects activated human T-cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels.

Clin-Immunol., 104 (2): 151 - 60



Cheeseman, K. H. und Slater, T. F., 1993

An introduction to free radical biochemistry.

Br-Med-Bull., 49: 481 - 93

Chiaradia, E., Avellini, L., Rueca, F., Spaterna, A., Porciello, F., Antonioni, M. T. und Gaiti, A., 1998

Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses.

Comp-Biochem-Physiol., 119(B): 833 - 6

Chow, C. K., 1991

Vitamin E and oxidative stress.

Free-Radic-Biol-Med., 11: 215 - 32

Cook, N. D. und Peters, T. J., 1986

The simultaneous hydrolysis of glutathion and glutamine by rat kidney gamma- glutamyl transferase.

Biochem-Biophys-Acta, 884: 207 - 10

Cotgreave, I. A. und Gerdes, R. G., 1998

Recent trends in glutathione biochemistry- glutathione- protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?

Biochem-Biophys-Res-Commun., 242: 1 - 9

Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. und Packer, L., 1982

Free radicals and tissue damage produced by exercise.

Biochem-Biophys-Res-Commun., 107: 1198 – 205

Denno, R., Rounds, J. D., Faris, R., Holejko, L. B. und Wilmore, D. W., 1996

Glutamine – enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state.

J-Surg-Res., 61 : 35 - 8

Dietz, O. und Huskamp, B., 1999

Handbuch Pferdepraxis.

F. Enke Verlag, Stuttgart

Dolphin, D., Poulson, R. und Avramovic, D., 1989

Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects.

Eds: Wiley, New York, Parts A und B

Dröge, W., Hack, V., Breitzkreuz, R., Holm, E., Shubinsky, G., Schmid, E. und Galter, D., 1998

Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia.

Biofactors, 8: 97 - 102

Ebbeling, C. und Clarkson, P. M., 1989

Exercise-induced muscle damage and adaptation.

Sports-Med., 7: 207 -34

Elstner, E. F., 1990

Der Sauerstoff.

Wissenschaftsverlag, Mannheim: 50 - 7

Evans, W., Cannon, J., 1991

Metabolic effect of exercise induced muscle damage.

Exerc-Sports-Sci-Rev., 23 : 135 - 66

Fish, J., Sporey, G., Beyer, K., Jones, J., Kihara, T., Kennedy, A., Apovian, C. und Jensen, G. L., 1997

A prospective randomized study of glutamine-enriched parenteral compared with enteral feeding in postoperative patients.

Am-J-Clin-Nutr., 65: 977 - 83

Flohe, L., Gunzler, W. A. und Ladenstein, R., 1976

Glutathione Peroxidase.

In: Glutathion metabolism and function.

(Eds.: Arias, I. M. und Jakoby, W. B.)

Raven, New York: 115 - 35

Fox, A. D., Kripke, S. A. und Berman, J. M., 1988

Dexamethasone administration induces increased glutaminase specific activity in the jejunum and colon.

J-Surg-Res., 44 : 391 - 6

Fürst, P., Pogan, K. und Stehle, P., 1997

Glutamine dipeptides in clinical nutrition.

Nutrition, 13 (7/8): 731 - 37

Geer, R. J., Williams, P. E. und Lairmore, T., 1988

Glucagon: an important stimulator of gut and hepatic glutamine metabolism.

Surg-Forum, 38: 27

Gilbert, H. F., 1995

Thiol/disulfid exchange equilibria and disulfid bond stability.

Meth-Enzymol., 251: 8 - 28

Gleeson, M., Robertson, J. D. und Maughan, R. J., 1987

Influence of exercise on ascorbic acid status in man.

Clin-Sci., 73: 501 - 5

Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W. C., Brooks, G. A. und Packer, L., 1988

Blood glutathione oxidation during human exercise.

J-Appl-Physiol., 64: 115 - 9

Gore, D. C. und Jahoor, F., 2000

Deficiency in peripheral glutamine production in paediatric patients with burns.

J-Burn-Care-Rehab., 21: 172 - 7

Griffith, O. W., Novogrodsky, A. und Meister, A., 1979

Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different  $\gamma$ - glutamyl transpeptidase activities.

Proc-Natn-Acad-Sci- U.S.A., 76: 2249 - 52

Griffith, O. W., 1999

Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis.

Free-Radic-Biol-Med., 27: 922 - 5

Griffiths, R. D., 2001

The evidence of glutamine use in the critically- ill.

Proc-Nutr-Soc., 60: 403 - 10

Grosskopf, J. F. W., Van Rensburg, J. J. und Bertschinger, H. J., 1983

Haematology and blood biochemistry of horses during a 201km endurance ride.

In: Equine exercise physiology

(Eds.: Snow, D. H., Perrson, S. G. B. und Rose, R. J.)

Granta Editions, Cambridge

Gürke, L., Marx, A., Sutter, P. M., Frentzel, A., Martinoli, S., Landmann, J. und Heberer, M., 1995

Ischämische Präconditionierung verbessert die postischämische Funktion, nicht aber den Energiemetabolismus der Skelettmuskulatur.

Swiss-Surg., 2: 107 - 9

Gul, M., Kutay, F. Z., Temocin, S. und Hanninen, O., 2000

Cellular and clinical implications of glutathione.

Ind-J-Exp-Biol., Vol. 38: 625 – 34

Hagen, T. M., Brown, L. A. und Jones, D. P., 1986

Protection against paraquat- induced injury by exogenous GSH in pulmonary alveolar type 2 cells.

Biochem-Pharmac., 35: 4537 - 42

Hagen, T. M., Aw, T. Y. und Jones, D. P., 1988

Glutathione uptake and protection against oxidative injury in isolated kidney cells.

Kidney-Int., 34: 74 - 81

Hammerqvist, F., Luo, J. L., Cotgreave, I. A., Andersson, K. und Wernerman, J., 1997

Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients.

Crit-Care-Med., 25: 78 - 4

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C., 1985

Oxygen radicals and the nervous system.

Trends Neurosci., 8: 22 – 2

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C., 1989

Free radicals in biology and medicine.

Clarendon, Oxford, 2. Eds.

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C., 1990

The antioxidants of human extracellular fluids.

Arch-Biochem-Biophys., 280: 1- 8

Halliwell, B. und Chirico, S., 1993

Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance.

Am-J-Clin-Nutr., 57 (5 Suppl): 715S - 24S; discussion 724S - 5S

Halliwell, B., 1997

Antioxidants and human disease: a general introduction.

Nutr-Rev., 55 (1 Pt 2): S44 - 9; discussion S49 - 52

Harward, T. R. S., Coe, D., Souba, W. W., Klingman, N. und Seeger, J. M., 1994

Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/ reperfusion.

J-Surg-Res., 56 : 351 - 5

Hodgson, D. R. und Rose, R. J., 1994

The equine athletic horse.

W. B. Saunders Company, Philadelphia

Houdijk, A. P., Rijnsburger, E. R., Jansen, J., Wesdorp, J., Weiss, J. K., McCarnish, M. A.,  
Teerlink, T., Meuwissen, S. G., Harman, H. J., Thijs, L. G. und van Leeuwen, P. A., 1998

Randomised trial of glutamine enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma.

Lancet, 352: 772 - 6

Hong, R. W., Rounds, J. D., Helton, W. S., Robinson, M. K. und Wilmore, D. W., 1991

Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury.

Ann-Surg., 215 (2): 114 - 9

Hughes, H., Jaeschke, H. und Mitchell, J. R., 1990

Measurement of oxidant stress in vivo.

Methods-Enzymol., 186: 681 - 5

Inoue, M., Kinne, R., Tran, T. und Arias, I. M., 1983

The mechanism of biliary secretion of reduced glutathione: analysis of transport process in isolated rat- liver canalicular vesicles.

Eur-J-Biochem., 134: 467 - 71

Jacinto, S. M. und Jandhyala, B. S., 1994

Comparative evaluation of the acute effects of oxygen free radicals on myocardial contractility in an anesthetized rat with those occurring in the early stages of splanchnic artery occlusion and hemorrhagic shock.

Free-Radic-Biol-Med., 17: 171 - 9

Jenkins, R. R., 1988

Free radical chemistry: relationship to exercise.

Sports-Med., 5: 156 – 70

Jepson, M. M., Bates, P. C. und Broadbent, P., 1988

Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle.

Am-J-Physiol., 255: E166 - E72



Ji, L. L. und Fu, R., 1992

Response of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide.

J-Appl-Physiol., 72: 549 - 54

Ji, L.L., 1995

Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients.

Free-Radic-Biol-Med., 18: 1079 - 86

Jones, J. H. und Lindstedt, S. L., 1993

Limits to maximal performance.

Annu-Rev-Physiol., 55: 547 - 69

Kanter, K. M., Hamlin, R. L., Unverferth, D. V., Davies, H. W. und Merola, A. J., 1985

Effects of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin.

J-Appl-Physiol., 59: 1298 - 303

Karner, J., Roth, E. und Funovics, J., 1984

Effects of burns on amino acid levels in rat plasma, liver and muscle.

Burns, 11: 130 - 7

Kelly, F. J., 1993

Free radical disorders of preterm infants.

Br-Med-Bull., 49 (3): 668 - 78

King, N. und Suleiman, M. S., 1998

Effect of regular training on the myocardial and plasma concentrations of taurin and  $\alpha$ -Amino acids in thoroughbred horses.

Amino-Acids, 15: 241- 51

Kirchgeßner, M., 1997

Tierernährung

Verlags Union Agrar, 10. Aufl.

Kraft, W. und Dürr, U. M., 1999

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

Schattauer Verlag, Stuttgart

Kretzschmar, M., Pfeifer, U., Machnik, G. und Klinger, W., 1992

Glutathione homeostasis and turnover in the totally hepatectomised rat: evidence for a high glutathione export capacity of extrahepatic tissues.

Exp-Toxicol-Pathol., 44: 273 - 81

Krzywanek, H., 1973

Untersuchungen zur Beurteilung der aktuellen Leistungsfähigkeit von Trabrennpferden.

Zbl-Vet-Med., 20 (4): 265 – 76

Lacey, J. M. und Wilmore, D. W., 1990

Is glutamine a conditional amino acid?

Nutr-Rev., 48: 297 – 309

Lash, L. H. und Jones, D. P., 1984

Renal glutathione transport: Characteristics of sodium- dependent system in the basolateral membran.

J-Biol-Chem., 259: 14508 - 14

Lash, L. H., Hagen, T. M. und Jones, D. P., 1986

Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury.

Proc-natn-Acad-Sci-U.S.A., 83: 4641 - 5

Leaf, D. A., Kleinman, M. T., Hamilton, M. und Barstow, T. J., 1997

The effect of exercise intensity on lipid peroxidation.

Med-Sci-Sports-Exerc., 29 (8): 1036 - 9

Lew, H., Pyke, S. und Quintanilha, A., 1985

Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise.

FEBS-Lett., 185: 262 - 6

Lew, H. und Quintanilha, A., 1991

Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidativ capacity and acetaminophen detoxification.

Eur-J-Drug-Metab-Pharmacokinet., 16: 59 - 68

Li, L. L., Fu, R. und Mitchell, E. W., 1992

Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. J-Appl-Physiol., 73: 1854 – 9

Lindner, A., von Wittke, P. und Esser, L., 1992

Training und Trainingsinhalte bei Galopprennpferden, 2. Mitteilung: Umfang und Intensität des Wettkampftrainings sowie praxisübliche Begriffe zur Bezeichnung von Trainingsinhalten.

Pferdeheilkunde, 8(5): 311 - 20

Liu, J., Yeo, H. C., Övervik- Douki, E., Hagen, T., Doniger, S., Chu, D. W., Brooks, G. A. und Ames, B. N., 2000

Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants.

J-Appl-Physiol., 89: 22 - 28

Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M. und Belcastro, A. N., 1987

Are indices of free radical damage related to exercise intensity?

Eur-J-Appl-Physiol., 56: 313 – 6

Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I., Asenjo, M. und Marques, J., 2002

Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death.

Int-J-Biochem-Cellbiol., 34, 439 - 58

Maxwell, S. R. J., Jakeman, P., Thomason, H., Leguen, C. und Thorpe, G. H. G., 1993

Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation.

Free-Rad-Res-Comm., 19 (3): 191 – 202

McCord, J. M., 1985

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.

N-Engl-J-Med., 312 (3): 159 - 63

McCord, J. M., 1993

Human disease, free radicals, and the oxidant/ antioxidant balance.

Clin-Biochem., 26 (5): 351 - 7

McLennan, P. A., Brown, R. A. und Rennie, M. J., 1987

A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle.

FEBS-Lett., 215: 187 – 91

McMeniman, N. P. und Hintz, H. F., 1992

Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses.

Equine-Vet-J., 24 (6): 482 - 4

Meister, A., 1984

New aspects of glutathione biochemistry and transport- selective alteration of glutathione metabolism.

Nutr-Rev., Vol.42 (12): 397 - 410

Meister, A. und Anderson, M. E., 1984

Glutathione.

Ann-Rev-Biochem., 52: 711- 60

Michiels, C., Raes, M., Toussiant, O. und Remacle, J., 1994

Importance of selen- glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn- SOD for cell survival against oxidative stress.

Free-Radic-Biol-Med., 17: 235 - 48

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. und Milner, A., 1993

A novel method for measurement antioxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.

Clin-Sci., 84: 407 - 12

Mills, P. C., Smith, N. C., Casas, I., Harris, P., Harris, R. C. und Marlin, D. J., 1996

Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse.

Eur-J-Appl-Physiol., 74: 60 - 66

Muelbacher, F., Kapadia, C. R. und Colpoys, M. F., 1984

Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle.

Am-J-Physiol., 247: E75 - E83

Neu, J., Roig, J., Meetze, W. H., Veerman, M., Carter, C., Millsaps, M., Bowling, D., Dallas, M., Sleasman, J., Knight, T. und Auestad, N., 1997

Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity.

J-Pediatr., 131: 691 – 9

Newsholme, E. A., Crabtree, B. und Ardawi, M. S. M., 1985

Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance.

Q-J-Exp-Physiol., 70: 473 - 89

Newsholme, E. A., 1994

Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well- trained and overtrained athletes.

Int-J-Sports-Med., 15: S142 - S47

Nurjhan, L., Bucci, A., Perriello, G., Stumvoll, M., Dailey, D., Toft, I., Jenssen, T. und Gerich, J., 1995

Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man.

L-Clin-Investig., 95: 272 - 7

O'Flaherty, L. und Bouchier-Hayes, D. J., 1999

Immunonutrition and surgical practice.

Proc-Nutr-Soc., 58: 831- 7

Ohlenschläger, G., 1991

Das Glutathionsystem.

Verlag für Medizin Dr. E. Fischer, Heidelberg

Ohlenschläger, G., 2000

Freie Radikale, oxidativer Stress und Antioxidantien.

Ralf Reglin Verlag, Köln

Ono, K., Inui, K., Hasegawa, T., Matsuki, N., Watanabe, H., Hasegawa, A. und Tomoda, I., 1990

The change of antioxidative enzyme activities in equine erythrocytes following exercise.

Jpn-J-Vet-Sci., 51 (4): 759 - 65

Parry-Billings, M., Blomstrand, E., McAndrew, N. und Newsholme, E. A., 1990

A communicational link between skeletal muscle, brain, and cells of the immune system.

Int-J-Sports-Med., 11 (2): S122 - S8

Prem, J. T., Eppinger, M., Lemmon, G., Miller, S., Nolan, D. und Peoples, J., 1999

The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/ reperfusion injury in the rat hind limb model.

Am-J-Surg., 178: 147 – 50

Reed, D. J., 1990

Glutathione: toxicological implication.

Annu-Rev-Pharmacol-Toxicol., 30: 603 - 31

Reed, S. M. und Bayly, W. M., 1998

Equine internal medicine.

W. B. Saunders Company, Philadelphia



Rokitzky, L., Logemann, E. und Sagredos, A. N., 1994

Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress.

Acta-Physiol-Scand., 151: 149 - 58

Rose, R. J., Ilkiw, J. E. und Arnold, K. S., 1980

Plasma biochemistry in the horse during 3-day event competition.

Equine-Vet-J., 12: 132

Ross, B. D., Hems, R. und Krebs, H. A., 1967

The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver.

Biochem- J., 102: 942 – 51

Roth, E., Zoch, G. und Schulz, F., 1985

Amino acid concentration in plasma and skeletal of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis.

Clin-Chem., 31: 1305 - 9

Roth, E., Karner, J. und Ohlenschläger, G., 1990

Glutamine: An anabolic effector?

J-Parent-Enter-Nutr., 14 (4): 130S - 6S

Sahlin, K., Ekberg, K. und Cizinsky, S., 1991

Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man.

Acta-Physiol-Scand., 142: 275 - 81

Salminen, A. und Vihko, V., 1983

Lipid peroxidation in exercise myopathy.

Exp-Mol-Pathol., 38: 380

Salloum, R. M., Souba, W. W. und Klimberg, V. S., 1998

Glutamine is superior to glutamate in supporting gut metabolism, stimulating intestinal glutaminase activity, and preventing bacterial translocation.

Surg-Forum, 40: 6

Schüep, W., Vuilleumier, J. P., Gysel, G. und Hess, D., 1984

Determination of ascorbic acid in body fluids, tissues and feed stuffs.

In: Proceedings of workshop on ascorbic acid in domestic animals.

(Eds: Wegger, I., Tagwerker, S. J. und Moustgaard, J.)

The royal danish agriculture society, Copenhagen: 50 - 5

Scott, R. D. und Curthoys, N. P., 1986

Renal tubular secretion of glutathion (GSH).

Fedn-Proc., 45: 1789 (Abstr.)

Sen, C. K., Marin, E., Kretzschmar, M. und Hänninen, O., 1992

Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization.

J-Appl-Physiol., 73: 1265 – 72

Sen, C. K., Ataley, M. und Hanninen, O., 1994

Exercise- induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency.

J-Appl-Physiol., 77: 2177 – 87

Sen, C. K. und Hanninen, O., 1994

Physiological antioxidants.

In: Exercise and oxygen toxicity

Elsevier science, Amsterdam: 89 - 126

Sen, C. K., Ookawara, T., Suzuki, K., Taniguchi, N., Hänninen, O. und Ohno, H., 1994

Immunoreactivity and activity of mitochondrial superoxid dismutase following training and exercise.

Pathophysiology, 1: 165 - 8

Sen, C. K., Rankinen, T., Väisänen, S. und Rauramaa, R., 1994

Oxidative stress after human exercise: effect of N- acetylcysteine supplementation.

J-Appl-Physiol., 77 (5): 2177 – 87

Sen, C. K., 1995

Oxidants and antioxidants in exercise.

J-Appl-Physiol., 79 (3): 675 - 86

Sen, C. K., Sies, H. und Baeuerle, P. A., 1999

Eds: Antioxidants and redox regulation of genes.

San Diego, Academic Press

Sies, H., 1999

Glutathione and its role in cellular functions.

Free-Radic-Biol-Med., Vol. 27 (9/10): 916 - 21

Shan, X., Aw, T. Y. und Jones, D. P., 1990

Glutathione- dependent protection against oxidative injury.

Pharmac-Ther., Vol. 47: 61 - 71

Sjodin, B., Westing, Y. H. und Apple, F. S., 1990

Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise.

Sports-Med., 10: 236 - 54

Smith, L. L., 1991

Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness?

Med-Sci-Sports-Exercise, 23: 542 - 51

Smith, R. J. und Wilmore, D. W., 1990

Glutamine nutrition and requirements.

J-Par-Ent-Nutr., 14 (4) : 94S - 9S

Smith, R. und Panico, K., 1985

Automated analysis of ophthalaidehyde derivated of amino acids in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography.

J-Liq-Chromatogr., 8: 1783

Snow, D. H., Ricketts, S. W. und Douglas, T. A., 1983

Post race blood biochemistry in thoroughbreds.

In: Equine exercise physiology.

(Eds.: Snow, D. H., Persson, S. G. B. und Rose, R. J.)

Granta Editions, Cambridge

Snow, D., 1990

Administration of ascorbate to horses.

In: Ascorbate in domestic animals.

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Symposium Kartause Ittingen, Schweiz.

Souba, W. W., Herskowitz, K., Salloum, R. M., Chen, M. K. und Austgen, T. R., 1990

Gut glutamine metabolism.

J-Parent-Enter-Nutr., 14 (4): 45S - 50S

Stohrer, M., Lutz, S. und Stangassinger, M., 2001

Antioxidativer Status von Neugeborenen und Jungtieren.

In: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier.

(Hrsg.: Schubert, R.)

8. Symposium 26. – 27. Sept. 2001, Jena, Thüringen: 361 - 4

Stohrer, M., Hammer, B., Hammer, R., Brincker, B. und Stangassinger, M., 2002

Oxidativer Stress infolge extremer physischer Belastung.

Tierärztl-Prax., 30 (K): 266 – 70

Stohrer, M., Lutz, S., Brincker, B. und Stangassinger, M., 2004

HPLC-Analytik von GSH/GSSG im Vollblut.

(unveröffentlicht)

Sumida, S., Tanaka, K., Kitao, H. und Nakadomo, F., 1989

Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation.

Int-J-Biochem., 21: 835 - 8

Svardal, A. M., Mansoor, M. A. und Ueland, P. M., 1990

Determination of reduced, oxidized, and protein bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography.

Anal-Biochem., 184: 338 - 46

Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. und Cohen, H., 1988

Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme.

Archs-Biochem-Biophys., 256: 677- 86

Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L. und Brooks, G. A., 1993

Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise.

J-Appl-Physiol., 75 (2): 566 – 72

Vinnars, E., Hammerquist, F., von der Decken, A. und Wernerman, J., 1990

Role of glutamine and its analogs in posttraumatic muscle protein and amino acid metabolism.

J-Parent-Enter-Nutr., 14 (4) : 125S - 9S

Welbourne, T., 1987

Interorgan glutamine flow in metabolic acidosis.

Am-J-Physiol., 253: F1069 - F76

White, A., Estrada, M., Walker, K., Wisnia, P., Filgueira, G., Vades, F., Araneda, O., Behn, C. und Martinez, R., 2001

Role of exercise ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses.

Comp-Biochem-Physiol., 128 (A): 99 - 04

Windmueller, H. G., 1982

Glutamine utilization by the small intestine.

Adv-Enzymol., 53: 201- 37

Windmueller, H. G. und Spaeth, A. E., 1980

Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats.

J-Biol-Chem., 255: 107

Wendel, A., 1980

Glutathion peroxidase.

In: Enzymatic Basis of Detoxication.

(Eds.: Jakoby, W. B.)

Academic Press, New York, Vol. 1: 333 - 52

Ziegler, T. R., Benfell, K., Smith, R. J., Young, L. S., Brown, E., Ferrari-Baliviera, E.,  
Lowe, D. K. und Wilmore, D. W., 1990

Safety and metabolic effects of L-Glutamine administration in humans.

J-Parent-Enter-Nutr., 14(4): 137S - 46S



## Danksagung

---

Allen voran danke ich Herrn Professor Stangassinger für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Stohrer für die hervorragende fachliche Betreuung und die gute Zusammenarbeit bedanken. Seine Kritik und Unterstützung waren wesentlicher Bestandteil einer guten Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich danke ich Frau Sieglinde Lutz für ihre Unterstützung und ihre Hilfe in der Ausarbeitung meiner Analysen und für die hervorragende Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Maurizio Cornali und seiner Assistentin Frau Heidi Kuprian bedanke ich mich ganz besonders für ihre Hilfe und Bereitstellung der Blutanalysegeräte in der Meraner Pferdeklinik.

Für die Realisierung der Untersuchungen in Meran möchte ich mich besonders bei Herrn Paolo Favero, seinem Assistenten Herr Alessandro Badalini und den anderen Mitarbeitern des Rennstalls bedanken.

Von ganzen Herzen bedanke ich mich bei meinen großartigen Eltern für ihre Liebe, ihr Vertrauen und die mir gewährte Ausbildung.

Bei meiner Schwester Barbara möchte ich mich bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei meiner Arbeit besonders unterstützte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Freunden Irina Lucke, Tanja Haferkorn, Cilla Peddinghaus, Lynda Hutchins, Andre Borusiak, Frederik Behrends und Harald Wüst, die mich besonders in dieser Zeit unterstützt haben und auf die ich mich auch noch in den letzten Sekunden verlassen konnte.

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name:	Bettina Brincker
Wohnort:	Konradstrasse 10a, 80801 München
Geburtsdatum:	30. Mai 1972
Geburtsort:	Bergisch-Gladbach
Vater:	Dr. jur. Walter Brincker, Notar
Mutter:	Inge Brincker, geb. Heyer, Heilpraktikerin

### Schul Ausbildung

1978 - 1982	Grundschule in Wuppertal
1982 - 1990	Städtisches Gymnasium in Wuppertal
1990 - 1991	Gymnasium Schloss Buldern
1991	Abitur

### Studium

Jan. 1992 - Okt. 1992	Sprachstudium an der Universität Pisa, Italien Studium der Veterinärmedizin
Okt. 1992 - Okt. 1993	Universität Pisa, Italien
Okt. 1993 - Okt. 1994	Universität Leipzig
Nov. 1994 - Aug. 2000	Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2000	3. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung
Seit Januar 2002	Promotionsstudium am Institut für Physiologie, physiologische Chemie und Tierernährung der LMU, München

### Berufliche Ausbildung

Jan. 2001- Dez. 2001	Assistentenstelle in der Pferdeklunik Meran, Italien
Seit Juni 2003	Teilzeit-Assistentenstelle in der Pferdepraxis Dr. Möllmann, Eurasburg
Seit März 2004	Teilzeit-Lehrkraft im Fach Physiologie an der Landwirtschaftlichen Schule Dietenheim, Italien